Aus der Medizinischen Universitätsklinik
und Poliklinik Tübingen
Abteilung Innere Medizin II
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. H. D. Waller

Antimitochondriale Antikörper bei der primär biliären Zirrhose - Isolierung und Charakterisierung eines neuen komplementbindenden Antigens - M8

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
(Klinische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen

vorgelegt von
JUDITH BRENNER
geb. Oehring
aus Braunschweig

1987

UNIV.
LIBRARY
KIEL

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543904_0085

Aus der Medizinischen Universitätsklinik
und Poliklinik Tübingen
Abteilung Innere Medizin II
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. H. D. Waller

Antimitochondriale Antikörper bei der primär biliären Zirrhose - Isolierung und Charakterisierung eines neuen komplementbindenden Antigens - M8

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
(Klinische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen

vorgelegt von
JUDITH BRENNER
geb. Oehring
aus Braunschweig

1987

Dekan:	Professor Dr. J. Dichgans
1. Berichterstatter:	Professor Dr. P. A. Berg
2. Berichterstatter:	Privatdozent Dr. E.-H. Egberts

Druck: Zeeb-Druck, Tübingen 7 (Hagelloch)

INHALTSVERZEICHNIS

1	**Einleitung**	1
2	**Methoden, Material, Markerseren und Patientenkollektive**	8
2.1	**Methoden**	8
2.1.1	Gewebsfraktionierung und Reinigung der Antigene aus äußerer Mitochondrienmembran	8
2.1.1.1	Präparation von äußerer Mitochondrienmembran aus Schweineniere	8
2.1.1.2	Ultraschallbehandlung der äußeren Mitochondrienmembran	11
2.1.1.3	Gelchromatographie	11
2.1.1.4	Bestimmung der Markerenzyme	11
2.1.2	Gewebsfraktionierung und Reinigung der Antigene aus Mikrosomen	13
2.1.2.1	Isolierung von Mikrosomen aus Schweineniere	13
2.1.2.2	Isolierung von Mikrosomen aus humaner Leber	15
2.1.2.3	Ultraschallbehandlung der Mikrosomen	15
2.1.2.4	Gelchromatographie	15
2.1.2.5	Gradientenzentrifugation	15
2.1.3	Enzymatische und physikalische Behandlung verschiedener Antigenfraktionen	16
2.1.3.1	Trypsinbehandlung	16
2.1.3.2	DNAse-Behandlung	16
2.1.3.3	Quecksilberbehandlung	16
2.1.3.4	Wärmebehandlung	17
2.1.4	Komplementbindungsreaktion	17
2.1.5	Proteinbestimmung	17
2.1.5.1	Proteinbestimmung nach BRADFORD	18
2.1.5.2	Proteinbestimmung nach LOWRYet al	18
2.1.6	SDS-Elektrophorese	18
2.2	**Material**	19
2.2.1	Organe	19
2.2.2	Reagenzien und Lösungen	20
2.2.2.1	Enzyme	20
2.2.2.2	Substrate	20
2.2.2.3	Weitere Reagenzien	20
2.3	**Markerseren**	21
2.4	**Patientenkollektive**	23
3	**Ergebnisse**	25
3.1	**Gewinnung des M8-Antigens**	25
3.1.1	Gewinnung des M8-Antigens aus äußerer Mitochondrienmembran von Schweinenieren	25
3.1.2	Gewinnung des M8-Antigens aus Mikrosomen von Schweinenieren	31
3.1.3	Gewinnung des M8-Antigens aus Mikrosomen von humaner Leber	34

3.2	**Physicochemische Eigenschaften des M8-Antigens**	37
3.2.1	Aktivität nach Trypsinbehandlung	37
3.2.2	Aktivität nach DNAse-Behandlung	37
3.2.3	Aktivität nach Quecksilberbehandlung	37
3.2.4	Aktivität nach Wärmebehandlung	40
3.2.5	Weitere physikochemische Eigenschaften	41
3.3	**Organ- und Speziesspezifität des M8-Antigens**	41
3.4	**Zusammenhänge zwischen Serologie und Klinik**	42
3.4.1	Prävalenz des anti-M8-Antikörpers bei der klassischen PBC und der Mischform PBC / CAH	42
3.4.2	Krankheitsspezifität der komplementbindenden anti-M8-Antikörper für die PBC und die Mischform PBC / CAH	47
3.4.3	Fallbeschreibungen und Krankheitsverläufe	48
3.4.3.1	PBC Typ 1: Patientin M.R., geb. am 25.1.30	48
3.4.3.2	PBC Typ 2: Patientin M.B., geb. am 16.1.1936	50
3.4.3.3	Mischform Typ 1: Patientin P.R., geb.am 15.6.1934	52
3.4.3.4	Mischform Typ 2: Patientin S. I., geb,.am 31.3.1932	54
4	**Diskussion**	56
5	**Zusammenfassung**	62
6	**Literaturverzeichnis**	63

Abkürzungen

Ag	Antigen
Ak	Antikörper
AMA	antimitochondriale Antikörper
ANA	antinukleäre Antikörper
AP	alkalische Phosphatase
ATPase	Adenosintriphosphatase
Bili	Bilirubin
BSA	Rinder (bovine) - Serumalbumin
CAH	chronisch aktive Hepatitis
DEAE	Diethylaminoethyl
DNAse	Desoxyribonuklease
DTT	Dithiotreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
FIAX	Fluorometrischer Immunoassay
GPT	Glutamat - Pyruvat - Transferase
HEPES	N-2 - Hydroxyethyl - Piperazin - N-2 - Ethansulfonsäure
IFL	Immunfluoreszenz
IgG	Immunglobulin G
IM	innere Membran
KBR	Komplementbindungsreaktion
MF	Mischform
OM	äußere Membran
PBC	primär biliäre Zirrhose
SDS	Sodium - Dodecyl - Sulfat - Polyacrylamid
SMA	Antikörper gegen glatte Muskulatur
Tris	Tris - (hydroxymethyl-)-aminomethan

1 EINLEITUNG

Antimitochondriale Antikörper sind bei der primär biliären Zirrhose (PBC) seit über 20 Jahren bekannt. Sie wurden zuerst von WALKER und Mitarbeitern (88), die Fluoreszenztechniken zum Nachweis der Antikörper angewandt hatten, als serologische Marker der PBC beschrieben. Sie fanden, daß Antikörper in Seren von Patienten mit PBC eine typische granuläre cytoplasmatische Fluoreszenz auf unfixierten Gefrierschnitten von Schilddrüsen-, Magen- und Nierengewebe hervorrufen können. Diese nicht organ- und nicht spezies-spezifische Fluoreszenz konnte auf die Mitochondrien lokalisiert werden. Eine Reaktion von PBC-Seren in der Komplementbindungsreaktion mit subzellulären mitochondrialen Fraktionen aus Rattenleber, Schweineniere und Rinderherz wurde 1967 von BERG und Mitarbeitern (11) nachgewiesen. Inzwischen werden auch sensitivere Methoden wie fluorometrische Immunoassays (FIAX, 42) und Enzym-Immunoassays (ELISA = *enzyme linked immunosorbent assay*) zum Nachweis antimitochondrialer Antikörper angewandt. Antimitochondriale Antikörper haben eine wesentliche Bedeutung als diagnostische Marker für die PBC erlangt.

Bei der PBC handelt es sich um eine Lebererkrankung noch ungeklärter Ätiologie, die durch die chronische nicht-eitrige Entzündung und Nekrose der septalen und interlobulären Gallengänge charakterisiert ist. Diese Zerstörung der intrahepatischen Gallengänge führt zu chronischer Cholestase und ihren pathologischen Folgen.

Erste Hinweise auf die primär biliäre Zirrhose waren wohl dermatologische Beobachtungen von Xanthomen und Xanthelasmen im Jahre 1826 (55). ADDISON und GULL berichteten 1851 von einigen Patienten mit einem Leiden, das sich vor allem in xanthomatösen Ablagerungen in der Haut manifestierte und bemerkten einen Zusammenhang mit Lebererkrankung und Gelbsucht. Sie vermuteten einen "direkten Einfluß der ungesunden Flüssigkeiten auf das Hautgewebe" (1). Die Natur dieser Beziehung blieb jedoch beinahe hundert Jahre unklar.

In ihrem klassischen Bericht von 1950 gaben AHRENS et al. (2) einen umfassenden Überblick über 22 Patienten mit primär biliärer Zirrhose,

was zur allgemeinen Anerkennung dieser Erkrankung als einer fest umrissenen Einheit führte. Sie empfahlen, den Begriff primär biliäre Zirrhose zu verwenden, wenn die Läsion oder Obstruktion intrahepatisch ist, und den Begriff sekundär biliäre Zirrhose bei einer Blockade der extrahepatischen Gallenwege.

Ihre Beobachtungen machten einige Merkmale des natürlichen Verlaufs der PBC klarer. Sie erkannten, daß die Erkrankung gewöhnlich schleichend mit Juckreiz oder Gelbsucht (oder beidem) beginnt, daß die hepatische Dysfunktion im allgemeinen bis zu einem sehr späten Stadium gering bleibt, und daß viele Patienten während des gesamten Verlaufs ihrer Erkrankung in einem präxanthomatösen Stadium verbleiben. Sie korrelierten das Auftreten der Xanthome mit dem Grad der Lipiderhöhung im Serum, betonten aber, daß sowohl extrahepatische wie auch intrahepatische Obstruktionen ähnliche Symptome hervorrufen können.

Da die Zirrhose erst spät im Verlauf der Erkrankung auftritt und insofern der Begriff primär biliäre Zirrhose für Frühstadien noch nicht ganz zutreffend ist, wurde 1965 von RUBIN et al. (69) vorgeschlagen, die Erkrankung *chronisch destruierende nichteitrige Cholangitis* zu nennen.

RUBIN, SCHAFFNER und POPPER (69) wie auch SCHEUER (74, 81) erweiterten die mikroskopischen Beobachtungen und definierten die histologischen Kriterien für die PBC. Die am weitesten anerkannte Stadieneinteilung ist diejenige von SCHEUER, die vier histologische Stadien der Erkrankung wie folgt beschreibt:

Das Stadium 1 umfaßt die floride Gallengangdestruktion, welche pathognomonisch für die PBC ist. Septale und interlobäre Gallengänge sind geschädigt und werden von einem dichten Infiltrat von Lymphozyten, großen Histiozyten, Plasmazellen und wenigen eosinophilen Granulozyten umgeben. Granulome werden entweder als schwach begrenzte Ansammlungen von Histiozyten oder als gut organisierte Granulome vom Tuberkulosetyp ohne zentrale Nekrose gesehen. Sie befinden sich gewöhnlich in der Nähe eines geschädigten Gallengangs im Periportalfeld. Die Grenzlamellen sind intakt.

Im Stadium 2 steht die duktuläre Proliferation mit irregulärer Expansion und chronischer Entzündung der Periportalfelder im Vordergrund. Die Gallengänge sind in ihrer Anzahl reduziert und ihr Platz wird von schlecht begrenzten Lymphozytenaggregaten eingenommen, welche zusammen mit der Fibrose und der Entzündung ein charakteristisches Erscheinungsbild abgeben. Granulome sind weniger häufig. Die Grenzlamellen sind zerstört.

Das Stadium 3 ist gekennzeichnet durch Vernarbung und partiale Regression der chronisch-entzündlichen Läsion. Die Fibrose überwiegt und ist assoziiert mit periportaler Stase. Mottenfraß-Nekrosen treten in unterschiedlichem Ausmaß auf.

Das Stadium 4 ist die Zirrhose mit Regenerationsknoten. Sie unterscheidet sich von den anderen Zirrhoseformen durch die reduzierte Anzahl der Gallengänge und einer daraus resultierenden Verminderung des Verhältnisses Gallengänge zu Periportalfeldern.

Aber auch die histologische Diagnose und Stadieneinteilung bringt, obwohl sie weitgehend anerkannt ist, einige Probleme mit sich, da der Vorgang der Gallengangschädigung nicht überall gleichzeitig im Lebergewebe einsetzt und mit wechselnder Geschwindigkeit an verschiedenen Stellen abläuft. So kann der bei der Nadelbiopsie entnommene Punktionszylinder für das Stadium der Erkrankung nicht repräsentativ sein, oder es können in einer Biopsie mehrere histologische Stadien nebeneinander zu finden sein (54, 81).

Neue diagnostische Kriterien für die PBC lieferte deswegen die Entdeckung antimitochondrialer Antikörper im Jahre 1965 (88).

Anfang der siebziger Jahre wurden zahlreiche Arbeiten publiziert, die über die Assoziation der PBC mit autoimmunen Syndromen. wie z.B. dem Sjögren-Syndrom (3) und der Sklerodermie (60, 65) referierten. Diese Beobachtungen legten nahe, daß es sich bei der PBC nicht nur um eine systemische Erkrankung handelt, sondern daß auch immunologische Mechanismen bei ihrer Pathogenese eine Rolle spielen (38).

Ungefähr 90% der Patienten mit primär biliärer Zirrhose sind Frauen. Die Erkrankung beginnt meist im mittleren Alter. Bei Kindern und Jugendlichen wurde sie bisher noch nicht beobachtet (79). Betroffen sind Menschen aller Nationalitäten, Rassen und sozioökonomischen Klassen. Ergebnisse epidemiologischer Studien zeigten eine Prävalenz von 40 bis 54 Fällen pro eine Million Einwohner (34, 35, 86). Eine genetische Prädisposition wird diskutiert, da gelegentlich eine familiäre Häufung der PBC auftritt (40), und antimitochondriale Antikörper bei nicht erkrankten Verwandten von PBC-Patienten nachgewiesen werden konnten (29, 30, 70, 87).

Erste Symptome der Erkrankung können Abgeschlagenheit und ein Juckreiz sein, der dann oft sehr quälend ist. Ikterus gehört zu den Spätmanifestationen (81). Bei der körperlichen Untersuchung der Patienten fällt etwa bei der Hälfte der Patienten eine Vergrößerung der Leber auf. Durchfall, Gewichtsverlust und Resorptionsstörungen der fettlöslichen Vitamine A, D, E und K mit den entsprechenden Mangelerscheinungen wie dyskeratotische Hautveränderungen, Osteoporose und Osteomalazie sowie Blutgerinnungsstörungen sind Folgen der Cholestase. Xanthome und Xanthelasmen der Haut treten als Zeichen eines gestörten Fettstoffwechsels auf. Symptome der portalen Hypertension sind meist erst in späteren Stadien vorhanden (38, 81). Bei ungefähr 70% der Patienten tritt im Verlauf der Erkrankung ein Sicca-Syndrom mit Xerostomie und Xerophthalmie auf; es wird diskutiert, daß diejenigen Mechanismen, die die entzündliche Gallengangsläsion hervorrufen, auch an den Ausführungsgängen anderer Drüsen im Rahmen einer polyglandulären Erkrankung angreifen (32, 33). Die Assoziation des Sicca - Syndroms mit der PBC wurde auch im Sinne einer *Graft-versus-host* - Reaktion interpretiert (27).

Die Diagnosestellung der Erkrankung ist im allgemeinen nicht schwierig. Eine Erhöhung der alkalischen Phosphatase als Leitbefund bei einer Frau mittleren Alters erfordert weitere Untersuchungen, welche die Bestimmung der anderen Cholestase-anzeigenden Enzyme miteinschließen sollte, um abzusichern, daß die erhöhte alkalische Phosphatase biliären Ursprungs ist.

Die Kombination einer hohen alkalischen Phophatase zusammen mit einer selektiven Erhöhung der Serumimmunglobuline vom IgM-Typ und ein normaler oder nur leicht erhöhter Bilirubinspiegel im Serum weist stark auf eine PBC hin (81).

Zur Sicherung der Diagnose trägt, wie bereits oben erwähnt, der Nachweis von antimitochondrialen Antikörpern bei.

Die für die PBC pathognomischen anti-M2-Antikörper, die mit einem Antigen der inneren Mitochondrienmembran reagieren, das nach Chloroformbehandlung von dem ATPase-Komplex dissoziiert werden kann (49, 50), konnten bei nahezu 100% der PBC-Patienten mit dem sensitiven fluorometrischen Immunoassay bzw. ELISA nachgewiesen werden (13, 42), jedoch in der weniger sensitiven Komplementbindungsreaktion (KBR) nur bei 78% der Patienten (13). Keines der Seren von Patienten mit anderen hepatischen oder nicht hepatischen Erkrankungen reagierte mit dem M2-Antigen in der KBR oder im ELISA (13, 42).

Neben M2 sind drei weitere mitochondriale Antigene, die eine Beziehung zur PBC haben, bekannt, nämlich das M4-, M8- und M9-Antigen.

Anti-M4-Antikörper, die gegen ein trypsininsensitives Antigen der äußeren Mitochondrienmembran gerichtet sind, werden nur gefunden, wenn auch anti M2-Antikörper im Serum nachweisbar sind, und kommen bei Patienten mit chronischen Lebererkrankungen, die histologisch sowohl Merkmale der PBC wie auch der chronisch aktiven Hepatitis aufweisen, vor (21).
Diese sogenannte Mischform läßt sich histologisch durch deutlichere entzündliche Aktivität, erkennbar an ausgeprägten Mottenfraß-Nekrosen wie auch Brückennekrosen (Verbindung portaler Felder mit der Zentralvene), und das seltenere Auftreten von Granulomen im Stadium 1 der Erkrankung von der PBC abgrenzen (46, 52).
Oft ist jedoch eine morphologische Differenzierung nicht eindeutig möglich, und die Unterscheidung gelingt erst in Verbindung mit biochemischen und serologischen Untersuchungen .
Im Frühstadium der Erkrankung liegen die Werte der Transaminasen und

des Bilirubins im Serum bei der Mischform höher als bei der PBC. Auch kommt es bei der Mischform zu einer starken Erhöhung der Serumimmunglobuline der IgM- wie auch der IgG-Klasse. Serologisch sichert das Vorkommen von anti-M4- oder von (nicht mitochondrialen) anti-MF2-Antikörpern die Diagnose Mischform.

Anti-M9-Antikörper können bei anti-M2-positiven wie auch anti-M2-negativen PBC-Patienten nachgewiesen werden, aber auch bei gesunden Verwandten von PBC-Patienten (57%), bei Laborpersonal, das mit PBC-Seren arbeitet (63%), und bei 15% der Normalbevölkerung, wenn die Seren im ELISA getestet werden. Sie reagieren mit einem organspezifischen Antigen, das mit der äußeren Mitochondrienmembran assoziiert ist. Diese anti-M9-Antikörper treten vorzugsweise bei Frühformen der PBC auf (13, 41, 44).

Die anti-M8-Antikörper hingegen waren in der Komplementbindungsreaktion bei Patienten mit PBC nur nachweisbar, wenn auch anti-M2-Antikörper im Serum dieser Patienten gefunden wurden, jedoch hatten nicht alle anti-M2-positiven Patienten den komplementbindenden anti-M8-Antikörper. Somit stellt letzterer eine neue Antikörperspezifität dar, mit der die klassische PBC in zwei weitere Untergruppen (PBC-Typ 1 = anti-M8-negativ und PBC-Typ 2 = anti-M8-positiv) unterteilt werden kann. Im Gegensatz zu den anti-M9-Antikörpern scheint das Vorkommen von anti-M8-Antikörpern eher auf einen ungünstigen Verlauf der PBC hinzuweisen (20, 90, 91). In nahezu allen Mischformseren (anti-M4- bzw. anti-MF2-positiv) konnten zusätzlich anti-M8-Antikörper nachgewiesen werden (20, 90, 91).

Bisher wurde das M8-Antigen in Anlehnung an die Methode von McFARLANE et al. (53) isoliert, indem der 105 000 g-Überstand eines Zellhomogenats aus Schweineniere in einem ersten Reinigungsschritt gelchromatographisch (Sephadex G 100) aufgetrennt wurde, der erste Peak (Ausschlußvolumen, Molekulargewicht über 150 000) konzentriert und einem zweiten Säulenlauf auf einem Sepharose-6B-Gel unterworfen wurde. Anschließend wurde der zweite Peak (KP2) dieses Laufs auf einen diskontinuierlichen Saccharosegradienten aufgetragen und 24 Stunden lang bei 205 000 g zentrifugiert. Zum Antikörpernachweis in der KBR diente der

Gradient 1.19 (91). Diese Methode war technisch aufwendig und beanspruchte drei Tage zur Antigenisolierung..

Ziel der vorliegenden Arbeit war, neue Isolierungsmethoden des M8-Antigens zu finden, um mit relativ geringem technischen Aufwand gereinigte Antigenfraktionen in reichlichem Ausmaß zu gewinnen. Von Interesse war außerdem, die Isolierungszeit zu verkürzen, um das Antigen auch für Nachweismethoden, die eine längere Inkubationszeit erfordern (wie z.B. ELISA) verwenden zu können, da die Haltbarkeit des M8-Antigens durch Wärmeinstabilität limitiert ist (90). Weiterhin wurden in dieser Arbeit die zuvor noch nicht eindeutig geklärte Lokalisation des M8-Antigens innerhalb der Zelle sowie seine Organspezifität, physiko-chemischen Eigenschaften und klinische Relevanz näher untersucht.

2 METHODEN, MATERIAL, MARKERSEREN UND PATIENTENKOLLEKTIVE

2.1 METHODEN

2.1.1 Gewebsfraktionierung und Reinigung der Antigene aus äußerer Mitochondrienmembran

2.1.1.1 Präparation von äußerer Mitochondrienmembran aus Schweineniere

Die Präparation von äußerer Mitochondrienmembran aus Schweineniere erfolgte modifiziert nach der Methode von SCHNAITMAN und GREENAWALT (75).

Als Isolationsmedium wurde folgender Puffer verwendet:

220 mM Mannitol
70 mM Saccharose
2 mM HEPES (vgl. Abkürzungsliste)
0,5 mg/ml BSA

Kurz vor der Präparation wurde der pH -Wert mit KOH auf 7,4 eingestellt.

Von der Niere frisch geschlachteter Schweine (nach Entnahme sofort in eisgekühltes Isolationsmedium gelegt) wurde für die Präparation nur die Rinde verwendet. Diese wurde in feine Würfel (1 cm^3) geschnitten und in eiskaltem Puffer gewaschen. 100 g Gewebe wurde in 200 ml eisgekühltes Isolationsmedium gegeben, in einem Mixer (Waring Blendor) bei 110 V auf der niedrigsten Stufe 6x10 Sekunden mit Unterbrechungen von je einer Minute zerkleinert. Anschließend wurden je 30 ml davon in einem Homogenisator nach DOUNCE (Braun Melsungen) bei 250 rpm mit vier Hüben homogenisiert.

Dieses Homogenat wurde mit Isolationsmedium zu einem 10%igen Homogenat verdünnt, das bei 1000 g 10 Minuten lang zentrifugiert wurde. Das Sediment wurde verworfen, der Überstand sorgfältig dekantiert und nochmals bei 1000 g 10 Minuten lang zentrifugiert. Dieser 1000 g-Überstand wurde nun bei 7000 g (Sorvall Rc5, Rotor SS 34) 10 Minuten lang zentrifu-

giert. Das die Mitochondrien enthaltende Sediment wurde zweimal gewaschen, indem es zuerst mit der Hälfte, beim zweiten Mal mit einem Viertel des ursprünglichen Volumens an Puffer resuspendiert und jeweils 10 Minuten lang bei 7000 g zentrifugiert wurde. Jedes Mal wurde die lockere Schicht (=*fluffy layer*) über dem Sediment sorgfältig entfernt.

Das Sediment der letzten Zentrifugation wurde mit sehr wenig Isolationsmedium im Handpotter resuspendiert und der Proteingehalt dieser Suspension wurde nach LOWRY et. al. (51) bestimmt.

Eine 2%ige Digitonin-Stammlösung wurde mit Isolationsmedium, das noch nicht mit BSA versetzt worden war, durch Erhitzen hergestellt und im Eiswasserbad abgekühlt; dann erst wurde BSA (0.5 mg/ml) hinzugegeben.
Zur Präparation der äußeren Mitochondrienmembran aus Schweineniere wurde eine Digitoninmenge von 1,07 mg Digitonin pro 10 mg mitochondriales Protein genommen.

Entsprechend der nach LOWRY et al. bestimmten Proteinkonzentration wurde die benötigte Digitoninmenge bzw. das erforderliche Volumen der 2%igen Stammlösung berechnet und dieses mit Isolationsmedium so weit verdünnt, daß die Mitochondriensuspension und die Digitoninlösung gleiches Volumen hatten. Nun wurden beide zusammengegeben, 15 Minuten lang in einem Handpotter vorsichtig durchgerührt, mit dem dreifachen Volumen an Puffer verdünnt und bei 12 000 g 10 Minuten lang zentrifugiert. Der Überstand wurde sorgfältig dekantiert, das Sediment mit gleichem Volumen an Puffer resuspendiert und ein weiteres Mal bei 12 000 g 10 Minuten lang zentrifugiert. Die 12 000 g-Überstände wurden gepoolt und bei 144 000 g eine Stunde lang zentrifugiert (Ultrazentrifuge Beckmann L 2 50 B). Das Sediment wurde mit wenig Isolationspuffer resuspendiert; diese Fraktion enthielt die äußere Mitochondrienmembran.
Direkt im Anschluß an die Präparation wurden die Markerenzymaktivitäten in dieser Fraktion bestimmt (siehe Abschnitt 2.1.1.4).

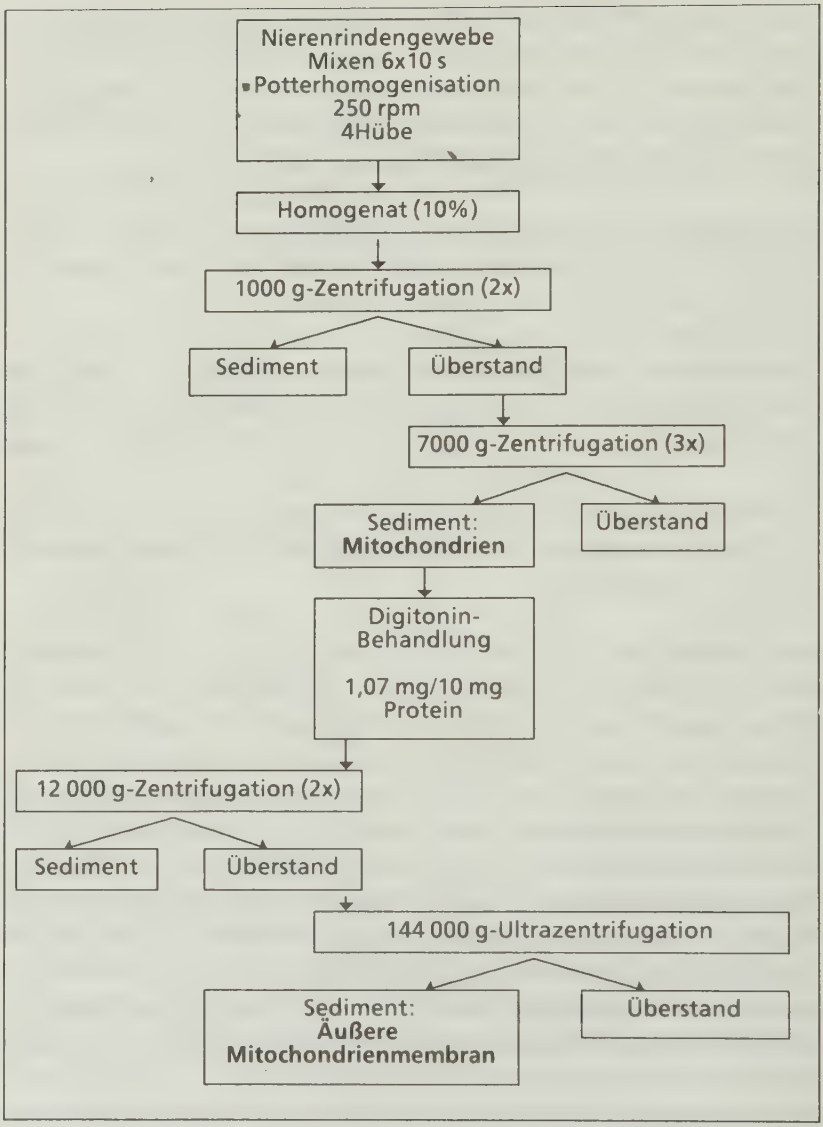


Abb. 1: Schematische Darstellung der Gewinnung äußerer Mitochondrienmembran aus Schweineniere

2.1.1.2 Ultraschallbehandlung der äußeren Mitochondrienmembran

Der Proteingehalt der Fraktion "Äußere Mitochondrienmembran" wurde nach LOWRY bestimmt und auf 8 mg/ml eingestellt. Anschließend wurde die äußere Mitochondrienmembran mit einem Branson Sonifier (Modell b12/B-15) auf Stufe 6 (maximal) mit einem Mikro-Tip achtmal für jeweils 30 Sekunden mit je 15 Sekunden Pause bei 0° C mit Ultraschall behandelt.

2.1.1.3 Gelchromatographie

Nach der Ultraschallbehandlung wurden 7 ml der beschallten äußeren Mitochondrienmembran auf eine Sepharose 6B-Säule aufgetragen, die ein Format von 100 cm x 2,6 cm (k26/100 Pharmacia) und ein Volumen von 480 ml hatte. Als Elutionspuffer diente ein Tris/EDTA-Puffer (0,1 M Tris; 0,2 M NaCl; 1 mM EDTA; 0,2 mM DTT; pH 8,0). Die Elutionsgeschwindigkeit betrug ein Tropfen pro 8 Sekunden. Durch ein UV-Absorptionsmeßgerät (KKB Uvicord) wurde die optische Dichte bei 254 nm gemessen und durch einen Mehrkanalschreiber aufgezeichnet. Die Fraktionen unter dem ersten und zweiten Peak wurden durch einen nachgeschallten Fraktionssammler gesammelt und danach in ihrem Volumen auf etwa ein Zehntel eingeengt. Hierzu wurde eine Berghof-Ultrafiltrationszelle mit Rührer verwendet, die in ein Eiswasserbad gestellt wurde. Als Membran wurde eine BM 100 Membran von Berghof gewählt, die für Moleküle bis zu einem Molekulargewicht von 10 000 durchlässig ist, und der Stickstoffdruck wurde auf 5 bar eingestellt.

2.1.1.4 Bestimmung der Markerenzyme

Als Markerenzyme wurden gewählt:
Succinat-Cytochrom-C-Reduktase für die innere Mitochondrienmembran.
NADH-Cytochrom-C-Reduktase (Rotenon-insensitiv) für die äußere Mitochondrienmembran

Die Aktivitäten dieser Enzyme wurden bestimmt, wie bei SOTTOCASA et al. (83) beschrieben. Die dazu notwendigen Reaktionsansätze sowie die

Wellenlänge, bei der die Absorption gemessen wurde, sind nachfolgend zusammengefaßt:

Succinat-Cytochrom-C-Reduktase
Reagenzien:

3,0 mM Succinat (Serva)
0,1 mM Cytochrom C (Böhringer)
0,3 mM KCN (Merck)
50 mM Phosphatpuffer pH 7,5
Wellenlänge: 550 nm

NADH-Cytochrom-C-Reduktase (Rotenon-insensitiv)
Reagenzien:

0,1 mM NADH (Böhringer)
0,1 mM Cytochrom C
0,3 mM KCN
1,5 µM Rotenon (Serva)50 mM Phosphatpuffer pH 7,5
Wellenlänge: 550 nm

Die Reagenzien wurden bis kurz vor Testbeginn bei 0° C aufbewahrt. In den jeweiligen Testansatz wurde eine bestimmte Menge des zu untersuchenden Antigens, dessen Proteingehalt zuvor nach LOWRY et al. (51) bestimmt worden war, hineingegeben. Durch Zugabe des Substrats wurde die Reaktion gestartet. Die Reduktion von Cytochrom C bei einer Temperatur von 25 °C wurde photometrisch gemessen und durch einen Schreiber graphisch registriert. Die Extinktionsänderung E konnte somit bestimmt werden und die Enzymaktivität daraus nach folgender Regel berechnet werden:

Volumenaktivität $A = \frac{V \times 1000}{v \times \varepsilon \times d} \times \frac{\Delta E}{\Delta t}$ (U/l)

Abkürzungen:
V = Volumen der Küvette = 3 ml
v = Volumen der Probe = 0,02 ml
d = Innenabstand der Küvettenwände = 1 cm
ε = Extinktionskoeffizient von Cytochrom C bei 550 nm = 27,7 $cm^2/\mu M$

Um die Aktivitäten miteinander vergleichen zu können. wurden sie als spezifische Aktivitäten auf 1 mg Protein bezogen.

2.1.2 Gewebsfraktionierung und Reinigung der Antigene aus Mikrosomen

2.1.2.1 Isolierung von Mikrosomen aus Schweineniere

Die Gewebsfraktionierung erfolgte in Anlehnung an die Methode von BERG et.al. (11). Aus dem mitochondrialen Überstand wurden die Mikrosomen nach DALLNER (24) isoliert. Als Isolationsmedium diente ein TSE-Puffer:

0,25 M Saccharose
10 mM Tris-Sulphat
10 mM EDTA pH 7,4

Nierenrindengewebe wurde in feine Würfel geschnitten, gewaschen und TSE-Puffer wurde im Verhältnis 2:1 hinzugegeben. Dann wurde es im Waring Blendor bei 110 V auf der niedrigsten Stufe gemixt. Die Potterhomogenisation erfolgte bei 370 rpm mit 3 Hüben. Nach Zentrifugation bei 700 g und bei 1000 g für 10 Minuten wurde jeweils der Überstand dekantiert und dieser dann bei 7 000 g 10 Minuten lang zentrifugiert. Im Sediment befanden sich die Mitochondrien. Der Überstand wurde ein weiteres Mal 15 Minuten bei 12 000 g zentrifugiert, um die Mitochondrien vollständig abzuzentrifugieren. Nach sorgfältigem Dekantieren wurde der Überstand anschließend 30 Minuten lang bei 100 000 g zentrifugiert. Das die Mikrosomen enthaltende Sediment wurde mit TSE-DTT-Puffer (0,2 mM DTT) im Handpotter resuspendiert. Die Proteinbestimmung erfolgte nach BRADFORD (22). Der Proteingehalt wurde auf 10 mg/ml eingestellt.

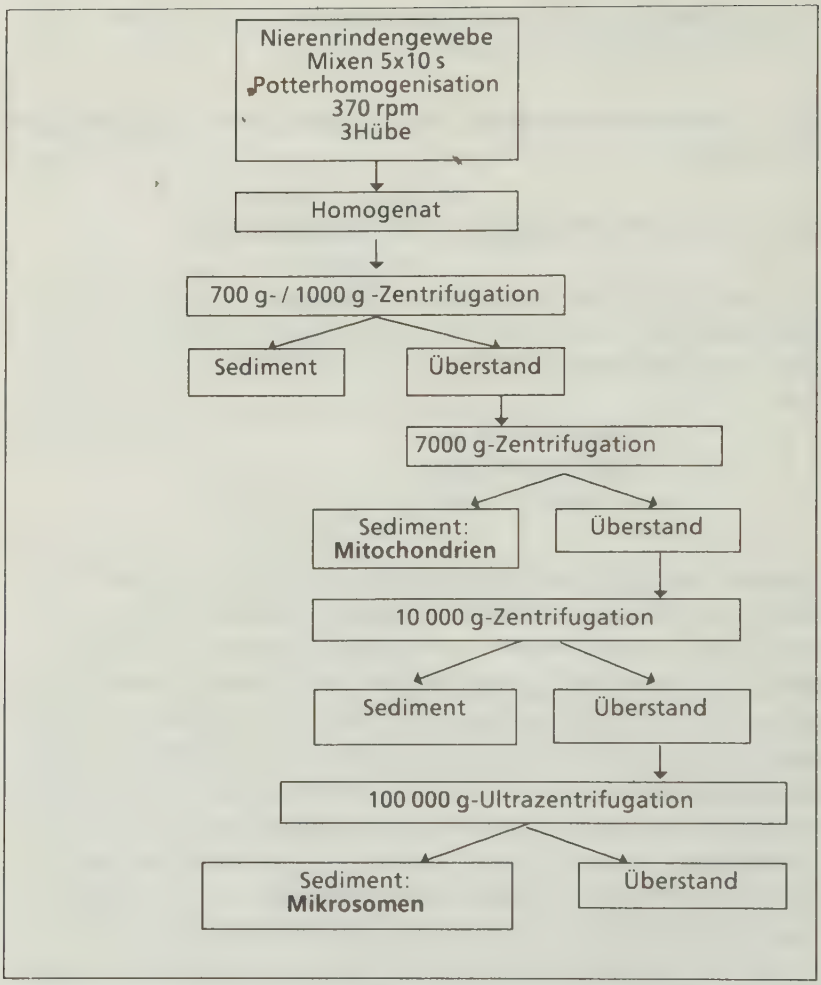


Abb. 2: Schematische Darstellung der Gewinnung von Mikrosomen aus Schweineniere

2.1.2.2 Isolierung von Mikrosomen aus humaner Leber

Die Mikrosomenisolierung aus humaner Leber (9 Stunden post mortem entnommen, siehe Abschnitt 2.2.1), erfolgte, wie zuvor bei der Nierenmikrosomenisolierung beschrieben. Der 7000 g Überstand wurde nochmals bei 12 000 g 10 Minuten lang zentrifugiert. Anschließend wurde er in der Ultrazentrifuge (Beckmann) 30 Minuten lang bei 100 000 g zentrifugiert. Das die Mikrosomen enthaltende Sediment wurde mit TSE-DTT-Puffer resuspendiert und der Proteingehalt wurde auf 7 mg/ml eingestellt. Anschließend wurden sie bei – 20 °C eingefroren.

2.1.2.3 Ultraschallbehandlung der Mikrosomen

Die Mikrosomen wurden mit einem Branson Sonifier (Mikro-Tip) auf Maximalstufe (6) 8 x 30 Sekunden (jeweils 15 Sekunden Pause) bei 0 °C beschallt.

2.1.2.4 Gelchromatographie

10 ml der beschallten Schweinenierenmikrosomen (bzw. 7 ml der Mikrosomen aus humaner Leber) wurden auf eine Sepharose 6B-Säule aufgetragen (K26/100 Pharmacia) und mit einem Tris / EDTA Puffer (0,1 M Tris; 0,2 M NaCl; 1 mM EDTA; 0,2 mM DTT; pH 8,0) eluiert. Die Fraktionen unter dem ersten, zweiten und dritten Peak wurden gesammelt und mit einer Berghof-Ultrafiltrationszelle über eine BM 100 Membran in ihrem Volumen auf etwa ein Zehntel eingeengt.

2.1.2.5 Gradientenzentrifugation

Die Zentrifugation erfolgte auf einem diskontinuierlichen Saccharosegradienten. Der Stufengradient bestand aus je 1 ml Saccharoselösung folgender Dichte bzw.Konzentration:

1,04 (10%)	1,16 (37%)
1,08 (20%)	1.19 (43%)
1,10 (24%)	1,24 (52%)
1,12 (29%)	1,28 (59%)
1,14 (34%)	

3,5 ml der Antigenlösung wurden auf diesen Gradienten gelegt. Die Zentrifugation erfolgte im Ausschwingrotor SW 40 (Beckmann) bei 39 000 rpm entsprechend 191 000 g für 18 Stunden bei 4 °C. Die einzelnen Gradientenstufen wurden mit einer Pasteurpipette sorgfältig abgenommen.
Wenn nicht anders angegeben, wurden die Gradienten für die KBR mit KBR-Puffer 1:4 verdünnt.

2.1.3 Enzymatische und physikalische Behandlung verschiedener Antigenfraktionen

2.1.3.1 Trypsinbehandlung

Das Antigen in Tris /NaCl /$CaCl_2$-Puffer (0,1 M Tris; 0,2 M NaCl; 12 mM $CaCl_2$; pH 7,8) mit einem Proteingehalt von 1 mg/ml wurde mit 50 µg Trypsin pro mg Protein (aus Rinderpankreas / Böhringer) im bewegten Wasserbad bei 27 °C eine halbe Stunde lang behandelt. Durch Zugabe von 100 µg Trypsininhibitor pro mg Protein (aus Hühnereiweiß, Böhringer) wurde die Reaktion gestoppt. Um Trypsin wieder vom Antigen zu trennen, erfolgte eine diskontinuierliche Gradientenzentrifugation im SW 40 - Ausschwingrotor für 18 Stunden bei 45 000 rpm und 4 °C. Die Gradienten wurden für die KBR 1:3 verdünnt. Eine Kontrollfraktion wurde mitgeführt.

2.1.3.2 DNAse-Behandlung

Das in Tris / NaCl gelöste Antigen wurde nach Pufferaustausch durch 24-stündige Dialyse gegen 30 mM Tris-Puffer (dreimaliger Pufferwechsel) und nach Zugabe von Ca^{2+}-Ionen (120 mM) und Mg^{2+}-Ionen (50 mM) mit 2624 U DNAse pro mg Protein behandelt (DNAse von Worthington, gelöst in Ampuwa). Die Inkubation erfolgte eine halbe Stunde lang bei 30 °C im bewegten Wasserbad. Eine Kontrollfraktion wurde mitgeführt. Gleich im Anschluß daran wurde eine KBR durchgeführt.

2.1.3.3 Quecksilberbehandlung

Die Quecksilberbehandlung wurde in Anlehnung an die Methode von Meek et. al. (57) durchgeführt.
Das Antigen, gelöst in Tris /NaCl-Puffer wurde mit 0.5 µM/mg Protein mit Mersalylacid behandelt. Da Quecksilber sehr schwer löslich ist, wurde zunächst eine 50 mM Stammlösung mit Mersalylacid in 10 mM Tris-Puffer, pH 7,6, hergestellt, die dann weiter 1:1000 verdünnt wurde. Von dieser

Quecksilberlösung wurde die dem Proteingehalt entsprechende Menge zur Antigenlösung gegeben und eine Stunde bei 4 °C inkubiert.
Dann wurde das Quecksilber durch eine Säulenchromatographie (K16/20 G15/TSE-Puffer) wieder vom Antigen getrennt.
Analog wurde die Quecksilberbehandlung mit einer Antigenfraktion durchgeführt, die in einem Tris /NaCl-Puffer gelöst war, der vorher mit DTT versetzt worden war (0,2 mM DTT). Für die Säulenchromatographie (K16/20; G15) wurde ein mit DTT versetzter TSE-Puffer (0,2 mM DTT) verwendet. Bei beiden Behandlungen wurden Kontrollfraktionen mitgeführt.

2.1.3.4 Wärmebehandlung

Von der Antigenfraktion wurden parallel je ein Teil bei 0 °C, ein Teil bei 37°C und ein dritter Teil bei 60 °C im Wasserbad eine halbe Stunde lang inkubiert. Gleich im Anschluß daran wurde eine KBR durchgeführt.

2.1.4 Komplementbindungsreaktion

Die qualitative Komplementbindungsreaktion (KBR) wurde nach der Methode von ROITT und DONIACH (67) durchgeführt. Das Antigen wurde auf eine Proteinkonzentration von 200 µg / ml mit verdünntem KBR - Puffer (1 Teil Ampuwa, 2 Teile KBR-Puffer: 1 Ca /Mg KBR Tablette pro 100 ml 0,01%iger Albuminlösung) eingestellt. Die Seren, darunter hochtitrige Standardseren, wurden von 1:64 bis zu 1:8000 austitriert. Dazu wurden 2 MHD Komplement, d.h. das 2fache der Menge, bei der die sensibilisierten Erythrozyten (mit Amboceptor) gerade hämolysiert werden, dazugegeben. Die Erythrozyten (Hammelblut) wurden auf eine 3%ige Suspension verdünnt.

2.1.5 Proteinbestimmung

Wenn nicht anders vermerkt, wurde die Bestimmung der Proteinkonzentrationen nach BRADFORD (22) durchgeführt. In gesonderten Fällen wurde die Proteinbestimmung nach LOWRY et al. (51) gewählt.

2.1.5.1 Proteinbestimmung nach BRADFORD

Das Reagenz wurde wie folgt angesetzt:
100 mg Coomassie Blue G 250 wurden in 50 ml absolutem Äthanol gelöst, 100 ml 85%ige Phosphorsäure hinzugefügt und die Lösung auf 1000 ml aufgefüllt. Anschließend wurde das Reagenz filtriert. Eine Eichkurve wurde mit Hilfe von Verdünnungsreihen von BSA angefertigt. Die Extinktion der Meßprobe, bestehend aus 0,1 ml Proteinlösung und 2 ml Bradford-Lösung wurde bei 595 nm in Plexiglasküvetten mit dem Photometer (Beckmann DB GT) gemessen.

2.1.5.2 Proteinbestimmung nach LOWRYet al.

0,5 ml Proteinlösung (Probe bzw. Verdünnungsreihe von BSA) wurden mit 0,5 ml 1 N Natronlauge versetzt und 5 ml alkalisches Kupferreagenz (frisch hergestellt) wurden hinzugegeben. Diese Lösung wurde 10 Minuten bei Raumtemperatur stehengelassen. Dann wurden 0,5 ml Folin-Ciocalteus-Phenolreagenz schnell zugefügt und gut gemischt. Danach ließ man die Lösung mindestens 30 Minuten lang stehen. Dann wurde die Extinktion bei 720 nm gemessen.

2.1.6 SDS-Elektrophorese

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurde nach der Methode von LÄMMLI (48) mit einem Sammelgel von 5% und einem Trenngel von 10% durchgeführt. Etwa 16 Stunden lang wurden die Gele in einem Tris /Glycin/SDS-Puffer (pH 8,3) einer Spannung von 70 V (40mA) ausgesetzt. Anschließend erfolgte eine Denaturierung bei 100 °C mit einem Tris /Glycin / SDS /Bromphenolblau-Puffer für 5 Minuten. Als Referenzproteine für die Molekulargewichtsbestimmung dienten folgende Marker:

Phosphorylase b 94 000
Albumin 67 000
Ovalbumin 43 000
Karboanhydrase 30 000
Trypsininhibitor 20 100
α-Laktalbumin 14 400 (calibration kit, Pharmacia)

2.2 MATERIAL

2.2.1 Organe

Schweinenieren sowie Rinderherz wurden direkt aus frischgeschlachteten Tieren im Schlachthof entnommen (Schlachthof Tübingen) und sofort in einen eisgekühlten TSE-Puffer gelegt.
Die Leber der Ratten (männliche Wistar-Ratten, 350 g schwer, 1 Tag gehungert) wurde auch sofort nach dem Tod entnommen und in eisgekühlten TSE-Puffer gelegt.
Die humane Leber stammte aus dem Pathologischen Institut der Universität Tübingen von einem Patienten, bei dem eine Lebererkrankung ausgeschlossen worden war. Neun Stunden post mortem wurde sie in einen eisgekühlten TSE-Puffer gelegt und direkt im Anschluß daran wurde mit der Präparation begonnen. Der Anfang der Präparation nach der Methode von BERG et al. (11) bis zum 7000 g-Überstand wurde freundlicherweise von Frau Reinhild Klein übernommen.

2.2.2 Reagenzien und Lösungen

2.2.2.1 Enzyme

Trypsin (aus Rinderpankreas)	Böhringer Mannheim
Trypsin - Inhibitor (aus Hühnereiweiß)	Böhringer Mannheim
Desoxyribonuklease	Worthington

2.2.2.2 Substrate

NADH·Na_2	Böhringer Mannheim
Cytochrom C (aus Pferdeherz)	Böhringer Mannheim
Succinat - Na_2·$6H_2O$	Serva Heidelberg

2.2.2.3 Weitere Reagenzien

Amboceptor (Anti-sheep-hemolysin 1:4000)	Behringwerke Marburg
BSA (Serumalbumin vom Rind)	Behringwerke Marburg
Erythrocyten (Hammelblut konserviert)	Behringwerke Marburg
HEPES	Serva Heidelberg
KBR - Puffer: eine Ca / Mg KBR - Tablette pro 100 ml 0.01%iger Albuminlösung	Oxoid Ltd. London
Komplement (preserved guinea pig serum)	Wellcome Beckenham
Mannitol	Serva Heidelberg
Rotenon	Serva Heidelberg
Säulenmaterial	Pharmacia Uppsala

Die hier nicht aufgeführten Reagenzien wurden von der Firma Merck/ Darmstadt in der höchst erhältlichen Reinheit bezogen.

2.3 MARKERSEREN

Um die Antigenspezifität der verschiedenen Antigenfraktionen nachzuweisen, wurden in der KBR klassische PBC-Seren und Mischformseren, deren Antikörpermuster gut definiert war, mitgetestet. Außerdem wurden Markerseren mit anderen antimitochondrialen und antimikrosomalen Antikörpern mitgeführt. Als Markerseren für das M8-Antigen wurden zwei hochtitrige PBC-Seren und zwei Mischform-Seren, die anti-M8 enthielten, genommen. Als Gegenkontrolle dienten zwei hochtitrige anti-M2 Seren, die anti-M8-negativ waren.
Für folgende spezifische Antikörper standen klar definierte Markerseren zur Verfügung.

Antikörper gegen Bestandteile innerer Mitochondrienmembran:

Anti-M1

Es handelt sich um einen Antikörper, der im Frühstadium der Syphilis gefunden wird und gegen ein Lipoprotein der inneren Membran, das Cardiolipin, gerichtet ist (94).

Anti-M2

Dieser Antikörper, der pathognomonisch für die PBC ist, ist gegen ein Antigen der inneren Membran, das mit der ATPase assoziiert ist, gerichtet. Das Antigen ist trypsinsensitiv (50).

Anti-M7

Bei Myokarditiden und bei Kardiomyopathien wurde ein Antikörper gefunden, der mit einem trypsinsensitiven Antigen aus innerer Mitochondrienmembran reagiert. Da dieser Antikörper nicht komplementbindend ist, werden anti-M7-Markerseren in den folgenden Untersuchungen nicht mitgetestet (43).

Antikörper gegen Bestandteile äußerer Mitochondrienmembran:

Anti-M3

Dieser Antikörper, der bei einer durch das Medikament Venopyranum induzierten Pseudolupus-Erkrankung vorkommt, erkennt ein fest an die Membran gebundenes Antigen, das trypsininsensitiv ist (71).

Anti-M4

Hierbei handelt es sich um einen Antikörper, der bei der sogenannten Mischform, einer cholestatischen chronisch aktiven Hepatitis, bei der antimitochondriale Antikörper nachweisbar sind, vorkommt und gegen ein trypsininsensitives Antigen der äußeren Mitochondrienmembran gerichtet ist (21).

Anti-M5

Der seltene Antikörper kommt bei Patienten mit atypischen Kollagenosen oder autoimmuner hämolytischer Anämie vor und reagiert mit einem trypsinsensitiven Antigen der äußeren Mitochondrienmembran (47).

Anti-M6

Wie bei anti-M3 handelt es sich hierbei um einen Antikörper bei einer medikamentös induzierten Erkrankung, nämlich einer durch Iproniazid hervorgerufenen Hepatitis. Er erkennt ein trypsininsensitives Antigen der äußeren Mitochondrienmembran (36).

Antikörper gegen Mikrosomen:

Anti-LKM

Antikörper, die gegen Mikrosomen von Leber- und Nierentubuluszellen gerichtet sind (*Liver-Kidney-Microsomes*), sind bei der seltenen Form einer iuvenilen chronischen Hepatitis nachzuweisen (66).

Weitere Antikörper:

Anti-MF2

Ein Teil der Seren der Patienten, die an der sogenannten Mischform erkrankt sind, enthält statt dem anti M4-Antikörper einen Antikörper, der gegen ein trypsinsensitives Antigen, das wahrscheinlich weder aus Mitochondrien noch aus Mikrosomen stammt, gerichtet ist (84).

2.4 PATIENTENKOLLEKTIVE

Es standen die Seren dreier Patientenkollektive (insgesamt von 134 Patienten) zur Verfügung, bei denen die Diagnose PBC durch klinische, biochemische und morphologische Kriterien gesichert war:
Seren von 36 Patienten stammten aus einem Kollektiv von PBC-Patienten, die im DRK-Krankenhaus Hamburg (früher Prof. Dr. Lindner, heute Dr. Fintelmann) über 10 bis 20 Jahre hinweg beobachtet wurden. Bei diesen Patienten war die Diagnose PBC durch histologische Untersuchungen von Prof. Dr. Klöppel (45) gesichert (siehe Tabelle 2).
Aus einem Kollektiv von PBC-Patienten der Heinz-Kalk-Klinik, Bad Kissingen (Prof. Dr. Müting), kamen Seren von weiteren 54 Patienten, bei welchen die histologischen Untersuchungen von Prof.Dr. Klinge durchgeführt worden waren (siehe Tabelle 3).
Ein drittes Kollektiv mit Seren von 44 PBC-Patienten wurde freundlicherweise von Herrn Privatdozent Dr. Wiedmann zur Verfügung gestellt. Das Kollektiv war aus Seren von Patienten verschiedener Londoner Kliniken zusammengestellt, deren Diagnose durch Leberhistologien von Prof. Dr. Scheuer gesichert war.

Alle übrigen Seren stammten entweder aus der Medizinischen Klinik Tübingen (z.T. auch histologisch gesichert durch Prof. Dr. Oehlert) oder von Patienten aus auswärtigen Krankenhäusern, deren Seren zur serologischen Untersuchung nach Tübingen geschickt worden waren.

Von wenigen Ausnahmen abgesehen, bei denen eine Penicillamin - Therapie oder eine immunsuppressive Therapie durchgeführt worden war, wurden die Patienten nur symptomatisch behandelt.

Als Vergleichskollektiv diente ein gemischtes Kollektiv von 57 Patienten mit anderen Leber- und Autoimmunerkrankungen aus der Medizinischen Klinik Tübingen.

Klinik	Anzahl der PBC - Patienten	Histologie
DRK - Krankenhaus Hamburg	36	Prof. Dr. Klöppel
Heinz - Kalk - Klinik	54	Prof. Dr. Klinge
Londoner Kliniken	44	Prof. Dr. Scheuer

Tab. 1: Herkunft der drei histologisch gesicherten PBC - Kollektive

Stadium	Anzahl	weiblich	männlich	Altersbereich
1	20	19	1	39 - 78
2	4	3	1	34 - 67
3	6	6	0	44 - 72
4	6	6	0	34 - 84
1 - 4	36	34	2	34 - 84

Tab. 2: Histologie, Alter und Geschlecht der 36 PBC - Patienten aus dem DRK - Krankenhaus Hamburg

Stadium	Anzahl	weiblich	männlich	Altersbereich
1	13	11	2	27 - 69
2	8	6	2	43 - 68
3	6	5	1	41 - 65
4	27	27	0	36 - 75
1 - 4	54	49	5	27 - 75

Tab. 3: Histologie, Alter und Geschlecht der 54 PBC - Patienten aus der Heinz - Kalk - Klinik Bad Kissingen

3 ERGEBNISSE

3.1 Gewinnung des M8-Antigens

3.1.1 Gewinnung des M8-Antigens aus äußerer Mitochondrienmembran von Schweinenieren

Äußere Mitochondrienmembran wurde aus Schweineniere in Anlehnung an die Methode von SCHNAITMANN and GREENAWALT (siehe Abschnitt 2.1.1.1) präpariert. Die Reinheit der so gewonnenen äußeren Mitochondrienmembran wurde mittels Aktivitätsmessungen von Markerenzymen überprüft. Als Markerenzyme für die innere Mitochondrienmembran (IM) diente die Succinat-Cytochrom-C-Reduktase, für die äußere Mitochondrienmembran (OM) die Rotenon-insensitive NADH-Cytochrom C-Reduktase. Zum Vergleich wurden die Enzymaktivitäten auch in intakten unbehandelten Mitochondrien sowie im *"Low speed pellet"*, dem 12 000 g-Sediment nach Digitoninbehandlung, das reich an innerer Mitochondrienmembran ist, gemessen. Die Kontamination der äußeren Mitochondrienmembran mit innerer Membran betrug in dieser Präparation 2,5%. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3 dargestellt.

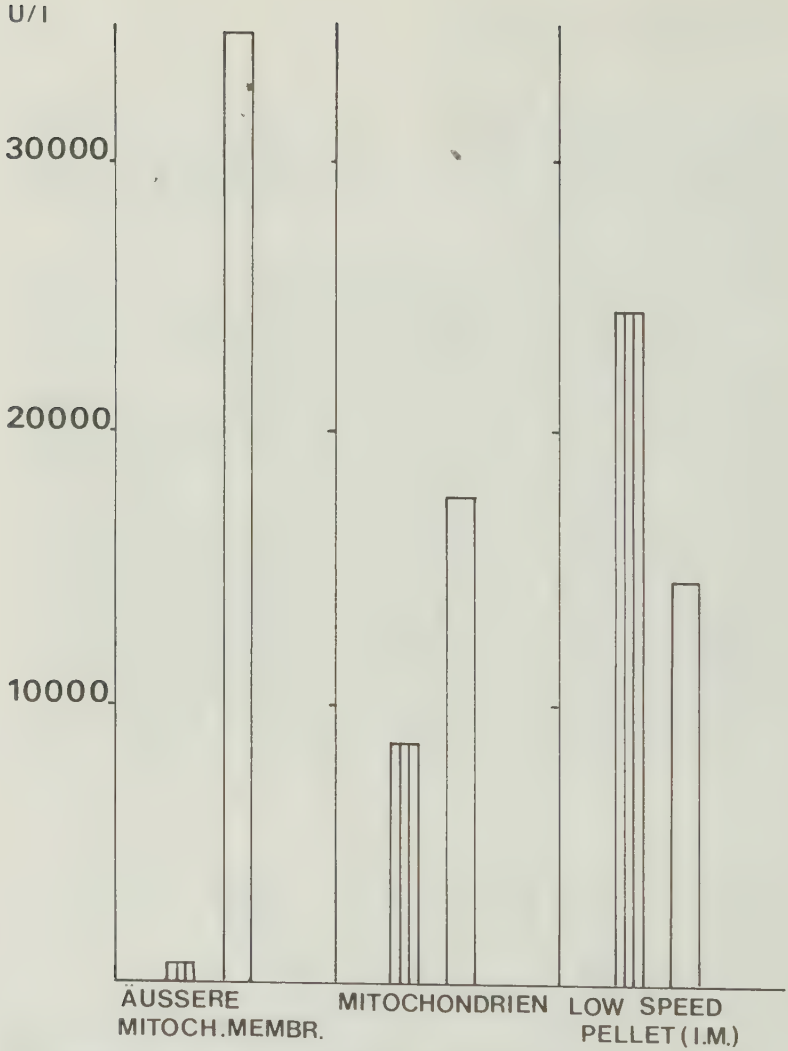


Abb. 3: Bestimmung der Markerenzymaktivität (spezifische Volumenaktivität) in den Fraktionen äußere Mitochondrienmebran, Mitochondrien und "low speed pellet" (Anreicherung innerer Membran)

Die äußere Mitochondrienmembran wurde nach Ultraschallbehandlung (siehe Abschnitt 2.1.1.2) über eine Sepharose-6B-Gelchromatographie (siehe Abschnitt 2.1.1.3) in mehrere Fraktionen aufgetrennt. Das Elutionsprofil ist in Abbildung 4 dargestellt.

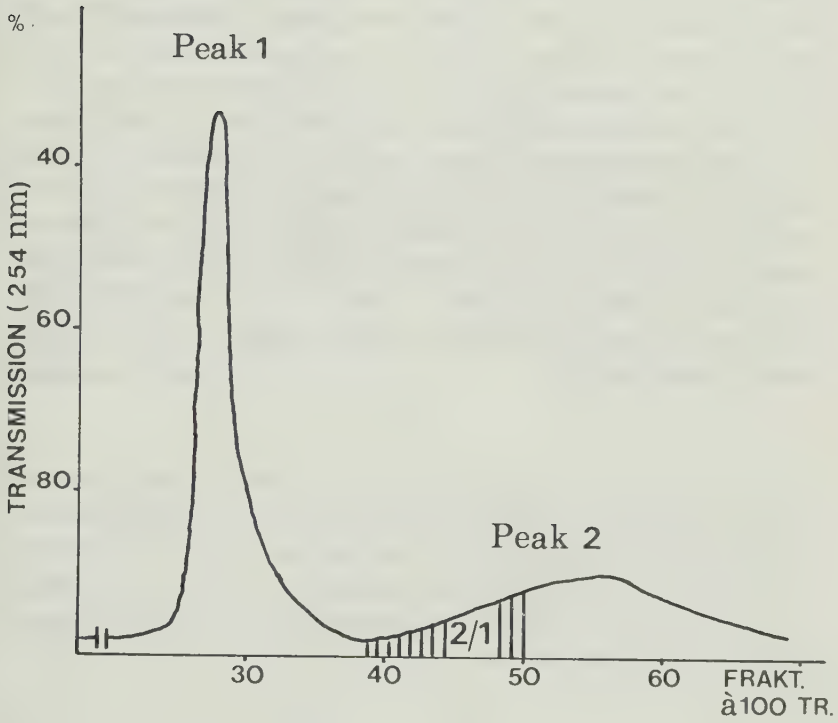


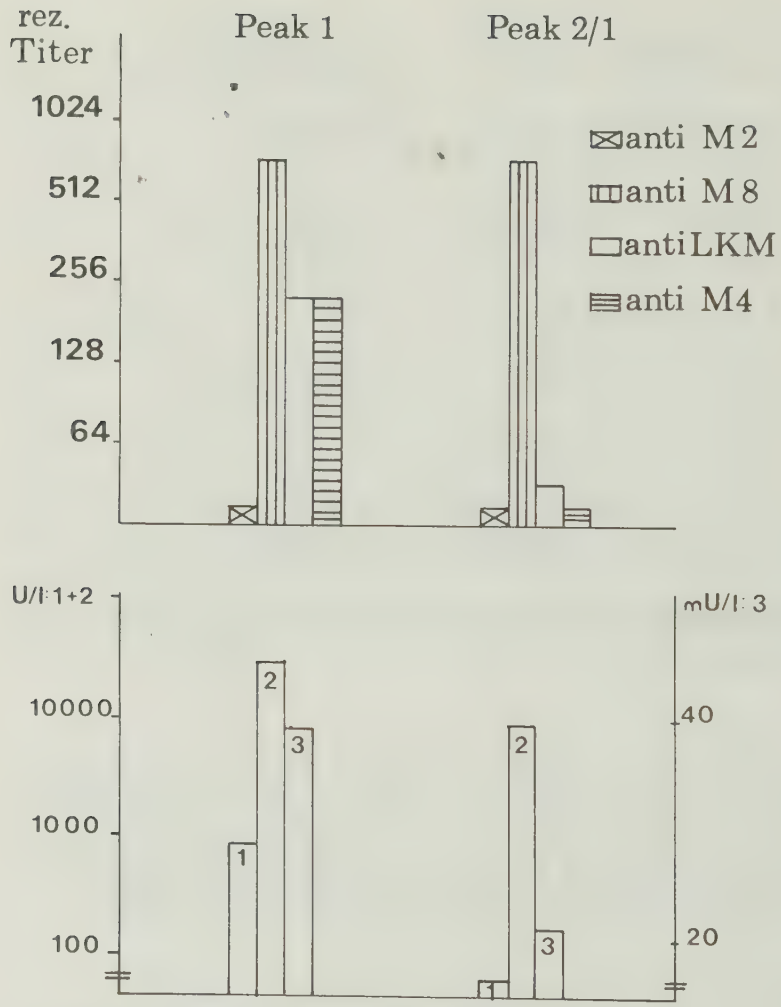
Abb. 4: Sepharose-6B-Gelchromatographie der beschallten äußeren Mitochondrienmembran aus Schweineniere. Gewinnung der M8-Frakion im ansteigenden Teil des 2. Peaks (senkrecht schraffiert: 2/1)

Die Fraktionen unter dem ersten und zweiten Peak wurden portionsweise gesammelt, in ihrem Volumen eingeengt und in der KBR mit Hilfe von Marker-Seren (siehe Abschnitt 2.3) auf deren mitochondrialen Antigene M2 bis M6 und auf M8 sowie auf das mikrosomale LKM-Antigen untersucht. Peak 1 enthielt das mikrosomale Antigen LKM, sowie alle anderen mitochondrialen Antigene, mit Ausnahme von M2, das nur in sehr geringer Konzentration vorhanden war. Im Anfangsteil des zweiten Peaks (Peak 2/1, in der Abbildung schraffiert markiert) wurde hohe Aktivität des komplementbindenden M8-Antigens, jedoch keine Aktivität des M2-Antigens gefunden. Mit dieser Peak-2/1-Fraktion war somit eine eindeutige Differenzierung zwischen PBC Typ 1-Seren (anti-M8-negativ) und PBC-Typ 2-Seren (anti-M8-positiv) möglich. Mischform-Seren, die sehr häufig den anti-M8-Antikörper enthielten, reagierten auch mit dieser Fraktion hoch positiv. Marker-Seren mit den Antikörpern anti-M3 bis anti-M6 reagierten negativ. Lediglich das Marker-Serum mit dem LKM-Antikörper zeigte - fakultativ je nach Präparation - eine schwach positive Reaktion. Der übrige Teil des zweiten Peaks enthielt nur noch eine geringe M8-Aktivität. Die Ergebnisse der KBR mit Peak 2/1 sind in Tabelle 4 noch einmal zusammengefaßt.

Markerseren	Antikörper-spezifität	reziproke KBR - Titer
PBC - Typ 1	anti M2	negativ
PBC - Typ 2	anti M2	
	anti M8	1000
Mischform	anti M2	
	anti M4	
	anti M8	512
	anti M3	negativ
	anti M4	negativ
	anti M5	negativ
	anti M6	negativ

Tabelle 4: Analyse der M8-Antigenfraktion Peak 2/1 aus äußerer Mitochondrienmembran mit Hilfe von Markerseren

Weitere Hinweise für die Assoziation des M8 - Antigens mit äußerer Mitochondrienmembran ergaben sich aus Untersuchungen der Antigenfraktionen Peak 1 und Peak 2/1 (aus äußerer Mitochondrienmembran von Schweineniere) mit Hilfe von serologischen und enzymatischen Markern; die Ergebnisse sind einander in Abbildung 5a und 5b gegenübergestellt.



[1] Markerenzym für innere Mitochondrienmembran
[2] Markerenzym für äußere Mitochondrienmembran
[3] Markerenzym für Mikrosomen

Abb. 5a und 5b: Analyse der Peak 1- und Peak 2/1-Fraktion mit Hilfe von serologischen (5a) und enzymatischen (5b) Markern. Hohe komplementbindende M8-Antigenaktivität bei gleichzeitig hoher Aktivität des Markerenzyms für äußere Mitochondrienmembran im Peak 2/1

Peak 1 reagierte in der KBR mit anti M8-Markerseren, aber auch mit den Markerseren anti-M4 und anti-LKM. Peak 2/1 hingegen, wie schon früher gezeigt, band nur Komplement mit dem anti-M8 Serum. Die Analyse durch Enzymmarker (die freundlicherweise von Herrn Stechemesser durchgeführt wurde), und zwar durch Succinat-Cytochrom-C-Reduktase als Marker für die innere Mitochondrienmembran, NADH-Cytochrom-C-Reduktase (rotenon-insensitiv) als Marker für die äußere Mitochondrienmembran und Glucose-6-Phosphatase (Bestimmung nach BAGINSKY et al., 6) als Marker für die Mikrosomen, zeigte, daß die im Peak 1 noch vorhandene Kontamination mit innerer Mitochondrienmembran und Mikrosomen im Peak 2/1 auf einen Bruchteil zurückgegangen war. Diese Untersuchungen verdeutlichen, daß eine Isolierung und Reinigung des M8-Antigens parallel geht mit der durch enzymatische Marker nachgewiesenen Anreicherung äußerer Membran unter Abnahme der enzymatischen Aktivität anderer Kompartimente. Daraus darf geschlossen werden, daß M8 mit der äußeren Mitochondrienmembran assoziiert ist.

3.1.2 Gewinnung des M8-Antigens aus Mikrosomen von Schweinenieren

Im Hinblick auf die aufwendige Präparation des M8-Antigens aus äußerer Mitochondrienmembran mit relativ geringem Antigenertrag wurden andere Verfahren gesucht, das M8-Antigen zu gewinnen. Da bekannt ist, daß sich äußere Mitochondrienmebran in den Mikrosomen anreichert, wurde versucht, ausgehend von einer mikrosomalen Präparation eine für den Routinezweck brauchbare M8-Fraktion zu isolieren.

Hierzu wurden Schweinenierenmikrosomen (Isolierung wie in Abschnitt 2.1.2.1 beschrieben) mit Ultraschall behandelt und zur weiteren Reinigung einer Sepharose-6B-Gelchromatographie unterzogen. Abbildung 6 zeigt das Elutionsprofil dieser Sepharose-6B-Gelchromatographie:

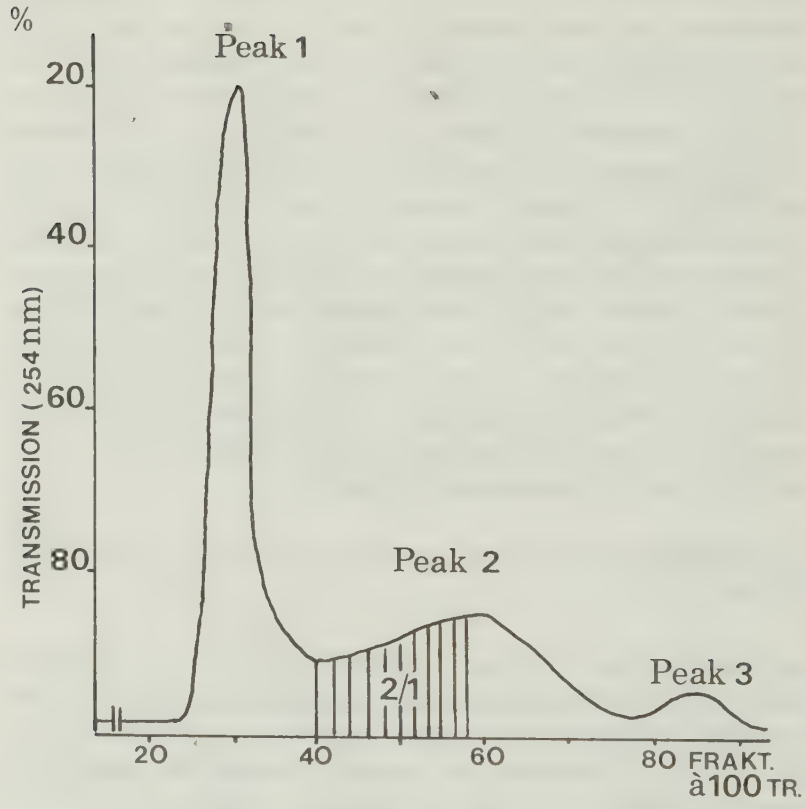


Abb 6: Sepharose-6B-Gelchromatographie der beschallten Mikrosomen aus Schweineniere: Gewinnung der M8-Fraktion im ansteigenden Teil des zweiten Peaks (senkrecht schraffiert: 2/1)

Die Fraktionen unter dem ersten, zweiten und dritten Peak wurden portionsweise gesammelt und, nachdem sie im Volumen eingeengt worden waren, in der KBR mit den entsprechenden Markerseren getestet (siehe Tabelle 5).
Der ansteigende Teil des zweiten Peaks (P2/1-Fraktion, in Abbildung 6 schraffiert) wies hohe M8-Aktivität auf. Andere mitochondriale Antigene, wie M2 bis M6, waren nicht nachweisbar.

Markerseren	Antikörper-Spezifität	reziproke KBR - Titer
PBC - Typ 1	anti M2	negativ
PBC - Typ 2	anti M2	
	anti M8	2000
Mischform	anti M2	
	anti M4	
	anti M8	2000
	anti M3	negativ
	anti M4	negativ
	anti M5	negativ
	anti M6	negativ
	anti LKM	2000

Tabelle 5: Analyse der M8-Antigenfraktion Peak 2/1 aus Schweinenieren-mikrosomen mit Hilfe von Markerseren

Legte man zur weiteren Reinigung den Peak 2/1 auf einen Saccharose-Stufengradienten (18-stündige diskontinuierliche Gradientenzentrifugation), so fand sich die M8-Aktivität in den Gradienten 1.16 bis 1.19.

Auch im Peak 2/1 der mikrosomalen Fraktion aus Schweineniere wurde die Markerenzymaktivität gemessen. Hier konnte eine geringe Aktivität

an Succinat-Cytochrom-C-Reduktase gegenüber einer hohen Aktivität an Rotenon-insensitiver NADH-Cytochrom-C-Reduktase gemessen werden (Kontamination 3,7 %).
Peak 1 enthielt das mikrosomale Antigen LKM, sowie auch alle anderen mitochondrialen Antigene M2 bis M6, wobei die Kontamination mit M2 gering war. Im Peak 3 wurde keines der mitochondrialen Antigene, die in Experimenten analysiert worden waren, gefunden.

3.1.3 Gewinnung des M8-Antigens aus Mikrosomen von humaner Leber

Um die Organspezifität des M8-Antigens zu untersuchen, wurde humane Leber als Ausgangsmaterial genommen und im Prinzip die gleichen Isolierungsmethoden wie bei den Schweinenierenmikrosomen angewandt.

Auch hier wurde eine Sepharose-6B-Gelchromatographie mit den beschallten Mikrosomen durchgeführt; Abbildung 7 zeigt das Elutionsprofil.

Der ansteigende Teil des zweiten Peaks, Peak 2/1 (schraffiert markiert), enthielt wie bei der Schweinenierenpräparation das M8-Antigen (allerdings mit geringerer Aktivität: Titer nur bis zu 1/512), während er frei von M2-, M3-, M4- und M5-Antigen war. Eine leichte Kontamination mit dem M6-Antigen war vorhanden. Im Gegensatz zur vorherigen Präparation fiel auf, daß das LKM-Markerserum nicht reagierte. Tabelle 6 faßt die Analyse der Peak-2/1-Antigenfraktion zusammen.

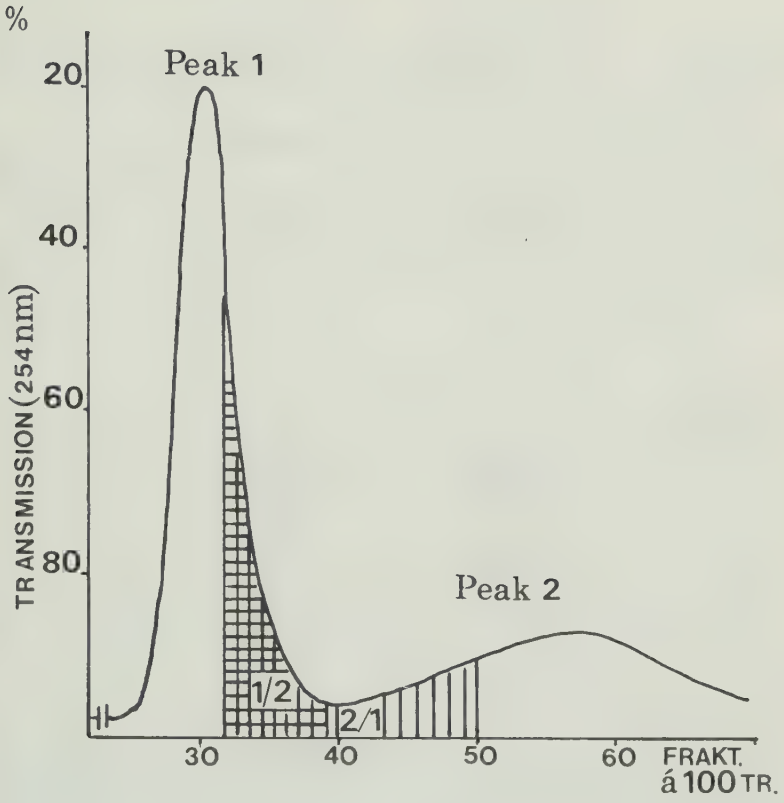


Abb. 7: Sepharose-6B-Gelchromatographie der beschallten Mikrosomen aus humaner Leber: Gewinnung der M8-Fraktion im ansteigenden Teil des zweiten Peaks (senkrecht schraffiert: 2/1) und einer Fraktion 1/2 (kariert), aus der nach diskontinuierlicher Gradientenzentrifugation das M8-Antigen in den Dichten 1.16 - 1.19 isoliert werden konnte

Markerseren	Antikörper-spezifität	reziproke KBR - Titer
PBC - Typ 1	anti M2	negativ
PBC - Typ 2	anti M2	
	anti M8	512
Mischform	anti M2	
	anti M4	
	anti M8	128
	anti M3	negativ
	anti M4	negativ
	anti M5	negativ
	anti M6	128
	anti LKM	negativ

Tabelle 6: Analyse der M8-Antigenfraktion Peak 2/1 aus humanen Lebermikrosomen mit Hilfe von Markerseren

Genauer untersucht wurde außerdem der zweite Teil des ersten Peaks, der Peak 1/2 (in der Abbildung kariert markiert), der mit dem anti-M2-Serum nicht reagierte, jedoch mit den Markerseren anti-M3 bis anti-M6 und anti-M8 positiv war. Eine weitere Trennung dieser Antigene konnte dadurch erreicht werden, daß man diesen Peak 1/2 einer diskontinuierlichen Saccharose-Gradientenzentrifugation unterwarf. Dabei zeigte sich, daß das M8-Antigen sich in den Dichten 1.16 bis 1.19 anreicherte, während sich die anderen Antigene bei einer Dichte von 1.08 bis 1.14 fanden.

3.2 Physicochemische Eigenschaften des M8-Antigens

Die nachfolgenden Untersuchungen wurden an der aus Schweinenierenmikrosomen gewonnenen M8-Fraktion durchgeführt.

3.2.1 Aktivität nach Trypsinbehandlung

Das M8-Antigen wurde einer proteolytischen Behandlung unterzogen, wie in Abschnitt 2.1.3.1 beschrieben. Abbildung 8a zeigt die M8-Aktivität der behandelten Fraktion sowie der unbehandelten Kontrollfraktion im Gradienten 1.19 Die M8-Aktivität wurde durch die Trypsinbehandlung zerstört. M8 ist also trypsinsensitiv.

3.2.2 Aktivität nach DNAse-Behandlung

Eine weitere Enzymbehandlung wurde mit DNAse durchgeführt (siehe Abschnitt 2.1.3.2). Die DNAse - Behandlung hat keinen Einfluß auf die Aktivität des M8-Antigens, wie aus Abb. 8b hervorgeht.

3.2.3 Aktivität nach Quecksilberbehandlung

Eine Quecksilberbehandlung wurde, wie in Abschnitt 2.1.3.3, mit zwei M8-Fraktionen, von denen eine 0,2 mM DTT enthielt, durchgeführt. Abbildung 9 zeigt die M8-Aktivität der so behandelten Fraktionen.

Die M8-Aktivität ließ sich durch die Quecksilberbehandlung nicht vollständig zerstören, aber doch erheblich vermindern, was nahelegt, daß SH-Gruppen an der antigenetischen Struktur des M8-Antigens teilnehmen und durch das Quecksilber blockiert werden. Dies steht im Einklang mit einer weiteren Beobachtung, nämlich daß das M8-Antigen durch eine geringe Menge an DTT (Dithiotreitol), das einen SH-Gruppen-Schutz-bietet, stabilisiert wird.

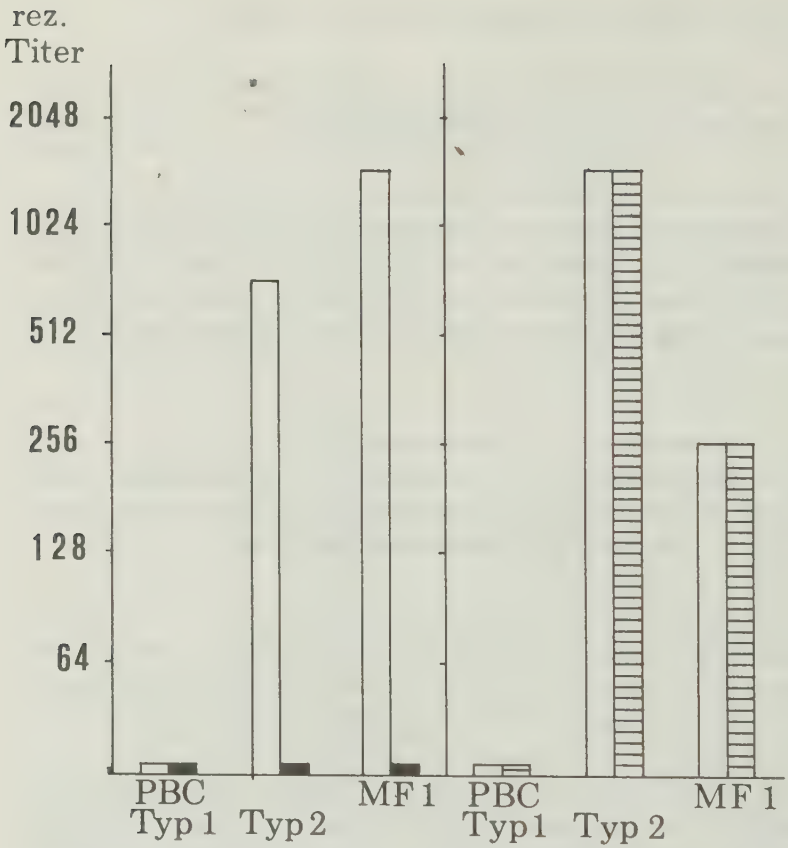


Abb. 8a: Trypsinbehandlung

unbehandelte M8-Fraktion

trypsinbehandelte M8-Fraktion

Abb. 8b: DNAse-Behandlung

unbehandelte M8-Fraktion

DNAsebehandelte M8-Fraktion

Abb.8: Komplementbindende M8-Aktivität nach Trypsin- und DNAse-Behandlung: Zerstörung der komplementbindeden M8-Aktivität durch Trypsinbehandlung, im Gegensatz dazu keine Beeinflussung der M8-Aktivität durch DNAse-Behandlung

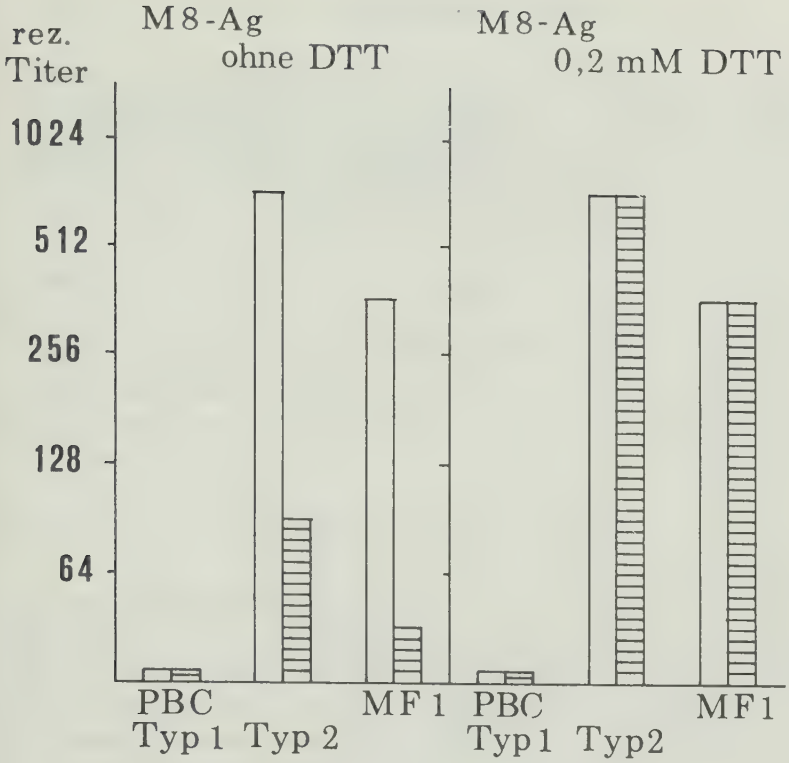


Abb. 9: Komplementbindende M8-Aktivität nach Quecksilberbehandlung einer M8-Fraktion ohne DTT und einer 0,2 mM DTT enthaltenden M8-Fraktion: Zerstörung der M8-Aktivität durch Quecksilber in der M8-Fraktion ohne DTT, im Gegensatz dazu Erhaltung der M8-Aktivität in der 0,2mM DTT enthaltenden Fraktion.

3.2.4 Aktivität nach Wärmebehandlung

Als physikalische Behandlung wurde eine Wärmebehandlung mit dem M8-Antigen durchgeführt. Von der Antigenfraktion wurde je ein Drittel bei 0° C, bei 37 °C und bei 60 °C eine halbe Stunde lang inkubiert. Abbildung 10 demonstriert die Wärmeinstabilität des M8-Antigens:

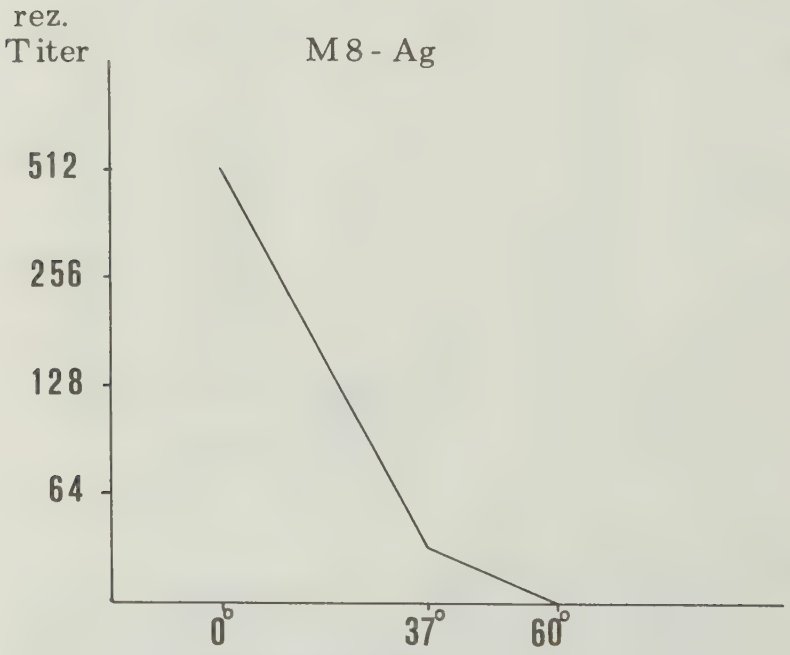


Abb. 10: Komplementbindende M8-Aktivität vor und nach Inkubation bei 37 °C und 60°C

Auch durch mehrmaliges Einfrieren und Auftauen bzw längere Lagerung bei 0 °C wurde die M8-Aktivität stark vermindert.

3.2.5. Weitere physikochemische Eigenschaften

Nach einer 18-stündigen diskontinuierlichen Gradientenzentrifugation wurde M8 bei den Dichten 1.16 bis 1.24 gefunden, während M4 und LKM sich im Bereich 1.08 bis 1.14 anreicherten.
Wurde eine Ultrafiltration der M8-Fraktion über eine BM 1 000-Membran durchgeführt, die für Moleküle bis zu einem Molekulargewicht von 100 000 durchlässig ist, wurde die M8-Aktivität über dem Filter gefunden, d. h. die aktive M8-Antigeneinheit hat ein Molekulargewicht von über 100 000.

Die SDS-Elektrophorese zeigte 5 starke und neun schwache Banden. Die Hauptbanden wanderten bei einem Molekulargewicht von 50 bis 100 K und entsprachen nicht den Hauptbanden, die bei der M2-Fraktion erhalten wurden.

3.3 Organ- und Speziesspezifität des M8-Antigens

Bisher wurden Methoden beschrieben, mit denen das M8-Antigen aus Schweineniere und humaner Leber gewonnen wurde. Das M8-Antigen aus Rattenleber zu gewinnen, gelang bisher jedoch nicht. Dabei wurden wie bei den anderen Präparationen beschallte Rattenlebermikrosomen über eine Sepharose-6B-Gelchromatographie aufgetrennt, deren Elutionsprofil dem der Schweinenierenmikrosomen glich. Jedoch wurde in dieser Präparation weder das M2-Antigen, noch das M8-Antigen gefunden, sondern nur das Mischformantigen. Auch aus Rinderherzmikrosomen ließ sich das M8-Antigen nicht getrennt isolieren, da durch eine M2-Antigenkontamination eine Differenzierung nicht möglich war. Aus den Experimenten mit Schweineniere und humaner Leber geht jedoch hervor, daß das M8-Antigen weder organspezifisch noch speziesspezifisch ist.

3.4 Zusammenhänge zwischen Serologie und Klinik

3.4.1 Prävalenz des anti-M8-Antikörpers bei der klassischen PBC und der Mischform PBC / CAH

Seren von 134 Patienten, bei denen die Diagnose klinisch, biochemisch und histologisch gesichert war (vgl. Abschnitt 2.4), wurden in der KBR gegen das M8-Antigen getestet. Dabei reagierten 62% der Seren (=83 Seren) negativ und 38% der Seren (=51 Seren) positiv.

Von den obengenannten 134 Patienten lagen auch histologische Stadieneinteilungen der PBC vor, die nach POPPER (69) und SCHEUER (74, 81) vorgenommen worden waren. Tabelle 7 zeigt die Verteilung der anti-M8-negativen und der anti-M8-positiven Seren in Bezug auf die verschiedenen histologischen Stadien:

Stadium	PBC Typ 1 M8 negativ	PBC Typ 2 M8 positiv		PBC Typ 1 M8 negativ	PBC Typ 2 M8 positiv
1	34 (79%)	9 (21%)	*Früh=*		
2	9 (60%)	6 (40%)	*phase*	43 (74%)	15 (26%)
3	14 (50%)	14 (50%)	*Spät=*		
4	26 (54%)	22 (46%)	*phase*	40 (52%)	36 (48%)
1-4	83 (62%)	51 (38%)			

Tab. 7: Prävalenz des anti-M8-Antikörpers bei der PBC, aufgegliedert nach den histologischen Stadien 1 bis 4, bzw. nach Früh- und Spätphase

Um die Darstellung zu vereinfachen und die histologischen Merkmale besser mit den serologischen Daten korrelieren zu können, wurde die Stadien 1 und 2 als Frühphase und 3 und 4 als Spätphase zusammengefaßt.

Im Vergleich zur Gesamtverteilung sind in der Frühphase etwa 3/4 der Seren anti-M8-negativ, in der Spätphase ist der Anteil der anti-M8-negativen und der anti-M8-positiven Seren ungefähr gleich.

Um zu untersuchen, ob der anti-M8-Antikörper ein Marker für die Aktivität der Erkrankung ist, ist es interessant zu wissen, wie die Verteilung innerhalb der anti-M8-negativen beziehungsweise der anti-M8-positiven Se-

ren in Bezug auf Früh-und Spätphase aussieht. Dies soll in den Abbildungen 11 und 12 veranschaulicht werden:

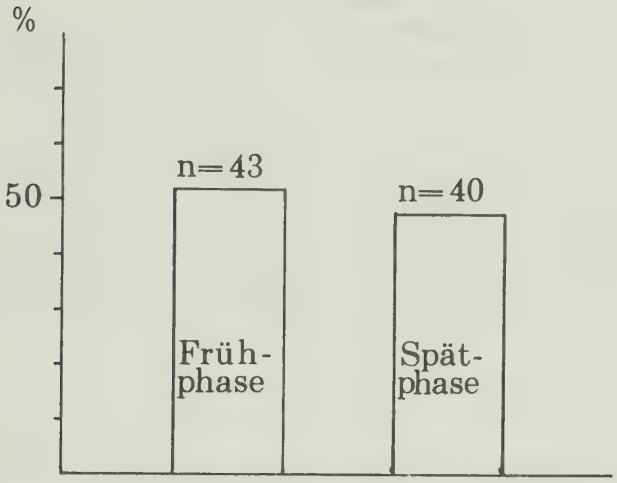


Abb. 11: Verteilung der PBC Typ 1-Seren (anti-M2-positiv, anti-M8-negativ) auf Früh- und Spätphase

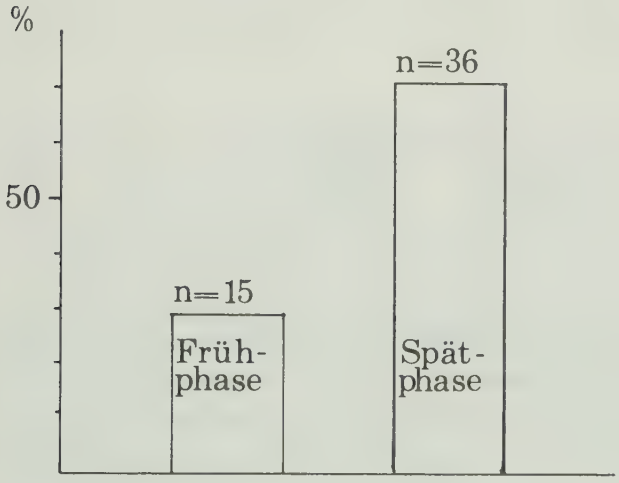


Abb. 12: Verteilung der PBC Typ 2-Seren (anti-M2-positiv, anti-M8-positiv) auf Früh- und Spätphase

Während die Patienten mit anti-M8-negativen Seren auf Früh- und Spätphase in etwa gleich verteilt sind, befinden sich bei den Patienten mit anti-M8-positiven Seren deutlich mehr Patienten in der Spätphase.
Interessant ist in diesem Zusammenhang auch das unterschiedlich häufige Auftreten einer Serum-Bilirubinerhöhung bei anti-M8-positiven und anti-M8-negativen PBC - Patienten. Seren von 66 klinisch, serologisch, z.T. auch histologisch klassifizierten PBC-Patienten wurden, nachdem der Bilirubinspiegel im Serum bestimmt worden war, in der KBR gegen das M8-Antigen getestet. Davon reagierten 30 Patienten negativ und 36 Patienten positiv. In den Abbildungen 13 und 14 wird die Verteilung der Bilirubinwerte nach den Kriterien normal und pathologisch in den beiden Kollektiven dargestellt. Dabei wurde als Grenzwert für Bilirubin der Wert 1,3 mg% genommen.

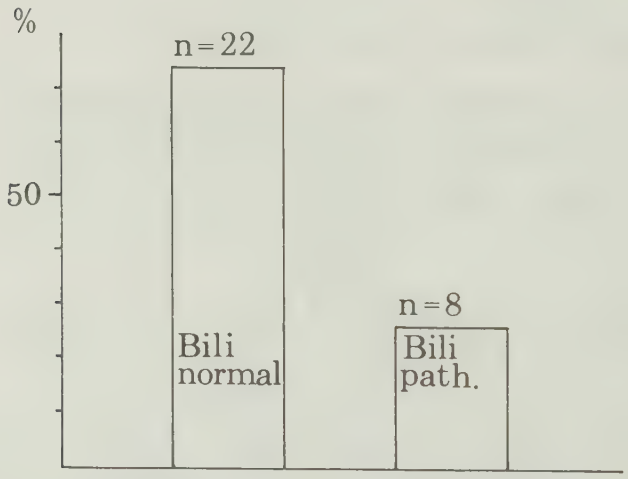


Abb. 13: Verteilung der Bilirubinwerte in einem PBC Typ 1-Kollektiv (anti-M2-positiv, anti-M8-negativ)

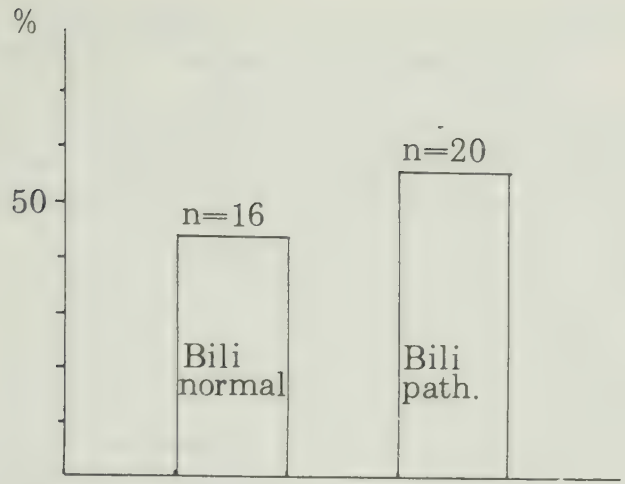


Abb. 14: Verteilung der Bilirubinwerte in einem PBC Typ 2-Kollektiv (anti-M2-positiv, anti-M8-positiv)

Es fällt auf, daß bei den PBC-Typ 1-Patienten (anti-M8-negativ) nur etwa ein Viertel pathologische Bilirubinwerte aufweist, während der Anteil der pathologischen Bilirubinwerte bei den PBC-Typ 2-Patienten über 50% liegt.

Wie bereits gezeigt wurde, tritt der anti-M8-Antikörper bei der klassischen PBC mit einer Frequenz von ungefähr 40 % auf.Bei der sogenannten Mischform (MF), einer AMA-positiven cholestatischen chronisch aktiven Hepatitis kommt der anti-M8-Antikörper in nahezu 100 % der Fälle vor. Serologisch sind Mischformen durch das Auftreten der Mischform-Antikörper anti-M4 beziehungsweise anti-MF2 definiert. In den meisten Fällen weisen sie auch anti-M2 und den anti-M8-Antikörper auf.
Ein Kollektiv mit 195 serologisch definierten PBC-Patienten und 30 Mischform-Patienten wurde auf das Vorhandensein des anti-M8-Antikörpers im Serum untersucht. In Abbildung 15 ist die Verteilung der KBR-Antikörpertiter dargestellt, wobei deutlich wird, daß kein signifikanter Titerunterschied zwischen den anti-M8-positiven Seren der beiden Kollektive besteht. In der Prävalenz unterscheiden sie sich jedoch signifikant

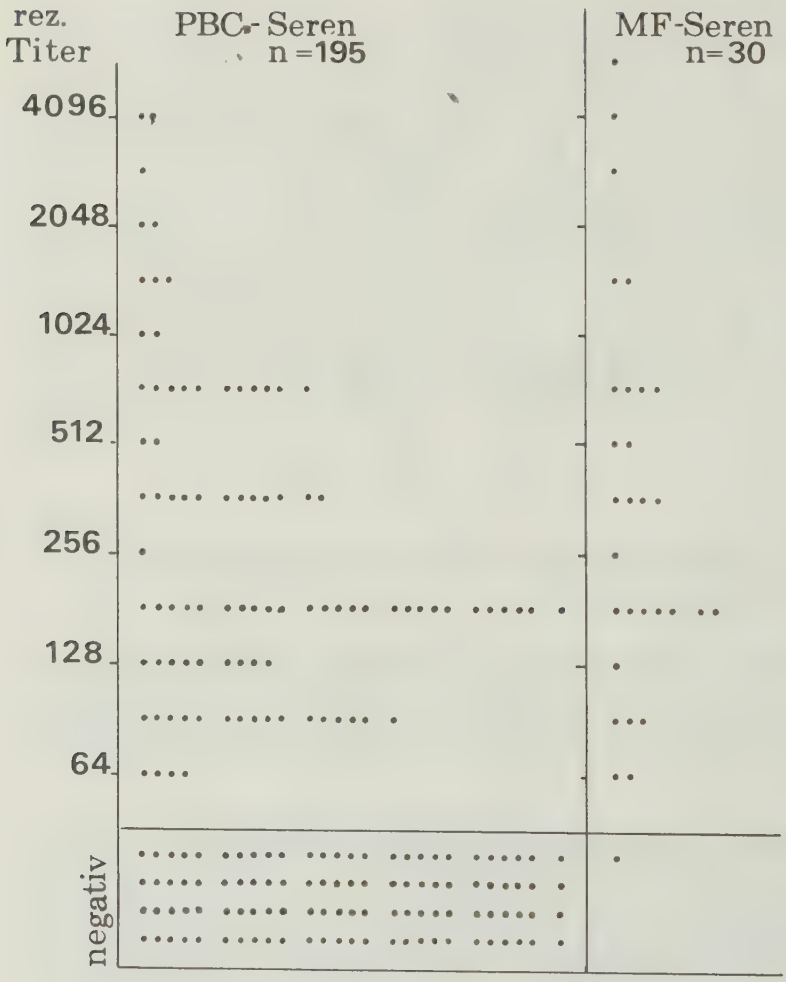


Abb.15: Titerverteilung in der KBR mit dem M8-Antigen bei Patienten mit klassischer PBC (anti-M2-positiv, anti-M4- bzw. anti-MF2-negativ) und der Mischform PBC / CAH (anti-M2-positiv, anti-M4- bzw. anti-MF2-positiv)

3.4.2 Krankheitsspezifität der komplementbindenden anti-M8-Antikörper für die PBC und die Mischform PBC / CAH

Die Seren von 57 Patienten mit anderen Leber- und Autoimmunerkrankungen wurden in der KBR gegen das M8-Antigen getestet. Wie Tabelle 8 zeigt, waren in keinem der Fälle anti-M8-Antikörper nachweisbar.

Diagnose	*Anzahl der getesteten Seren*	*Anzahl der pos. Seren in der KBR*
Primär biliäre Zirrhose	134	51
Mischform PBC / CAH	30	29
andere Lebererkrankungen:		
Hepatitis B	12	0
NonA- NonB- Hepatitis	12	0
Nutritiv- toxische Leberzirrhose	12	0
andere Autoimmunerkrankungen:		
Lupus erythematodes	8	0
Rheumatoide Arthritis	13	0

Tabelle 8: Krankheitsspezifität der komplementbindenden anti-M8-Antikörper für die PBC und die Mischform PBC / CAH

3.4.3 Fallbeschreibungen und Krankheitsverläufe

Zur Veranschaulichung der verschiedenen Untergruppen der PBC bzw. der Mischform PBC / CAH soll nun zu jedem Antikörpermuster eine Fallbeschreibung mit Darstellung des Krankheitsverlaufes bezüglich der klinischen, histologischen, biochemischen und serologischen Parameter vorgestellt werden.

3.4.3.1 PBC Typ 1: Patientin M.R., geb. am 25.1.30

Die ersten Symptome der Erkrankung traten bei der Patientin im Alter von 42 Jahren in Form eines heftigen Juckreizes auf. Ein Jahr später konnte eine vergrößerte Leber und ein Palmarerythem nachgewiesen werden. Vier Jahre nach Krankheitsbeginn kamen Abgeschlagenheit und Arthralgien hinzu.
In der Immunfluoreszenz konnten antimitochondriale Antikörper nachgewiesen werden. Der anti-M2-Antikörper war in der KBR nur schwach nachweisbar, im ELISA eindeutig positiv. Anti-M4- und anti-M8-Antikörper konnten in der KBR nicht nachgewiesen werden.
Wiederholt wurden Leberbiopsien entnommen, die entweder eine PBC im Stadium 1 oder geringgradige Veränderungen im Sinne einer CAH zeigten. Die acht Jahre nach Krankheitsbeginn entnommene Leberbiopsie zeigte noch das Stadium 1 bis 2 einer PBC.
Eine Therapie mit Azathioprin und Kortikosteroiden, die zwischenzeitlich für ein Jahr durch eine Penicillamintherapie abgelöst worden war, worauf die alkalische Phosphatase und die Transaminasen angestiegen waren, wurde während dem gesamten Krankheitsverlauf durchgeführt. Der Bilirubinwert blieb zehn Jahre lang im Normbereich.
Insgesamt kann die Krankheitsaktivität als gering angesehen werden.

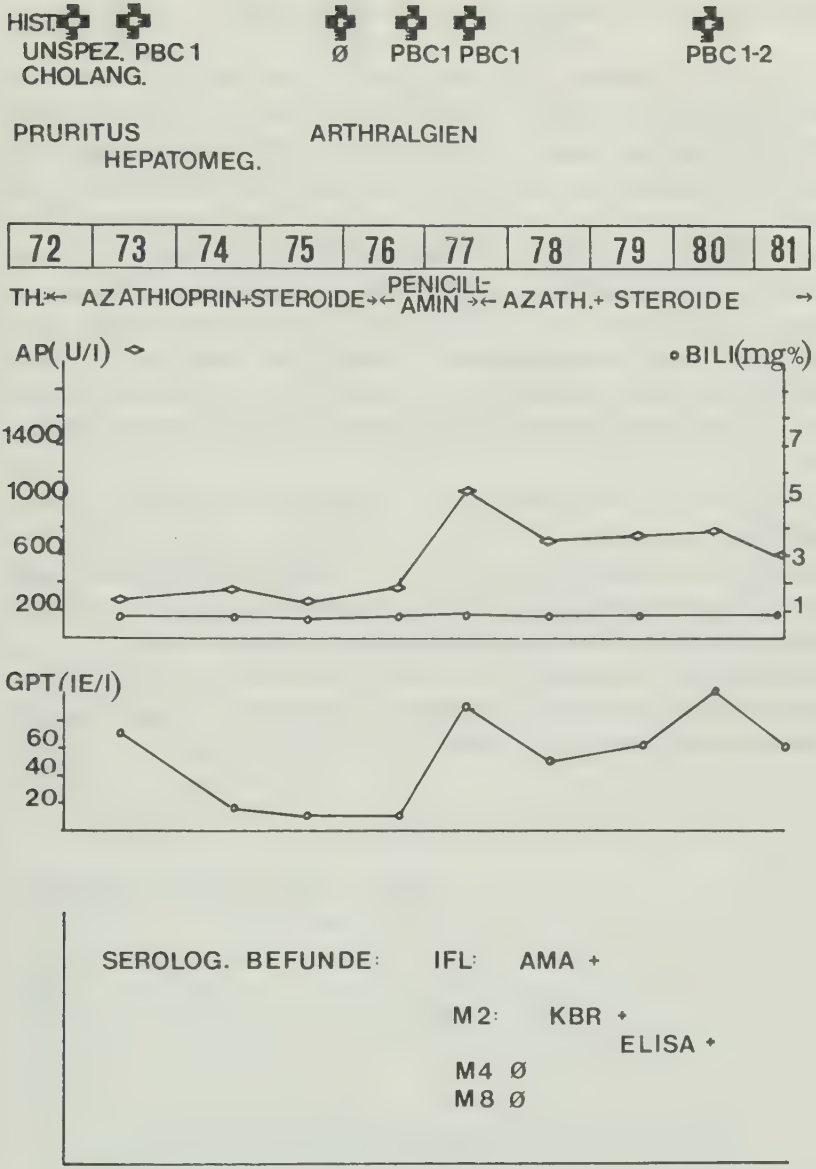


Abb. 16: Krankheitsverlauf einer Patientin (M. R., geb. am 25. 1. 30) mit PBC vom Typ 1 (anti-M2-positiv, anti-M4- und anti-M8-negativ)

3.4.3.2 PBC Typ 2: Patientin M.B., geb. am 16.1.1936

Im Alter von 42 Jahren wurde die Patientin zur Abklärung seit längerer Zeit erhöhter Leberwerte stationär eingewiesen. Bei der körperlichen Untersuchung fiel eine Hepatomegalie auf. Die histologische Untersuchung der damals entnommenen Leberbiopsie ergab eine primär biliäre Zirrhose im Stadium 1.

Da die Patientin sich in einem guten Allgemeinzustand befand, hielt man eine Therapie zu diesem Zeitpunkt für nicht erforderlich. Die fünf Jahre nach Krankheitsbeginn entnommene Leberbiopsie zeigte bereits einen narbigem Umbau. Der Befund entsprach einem Stadium 2 bis 3 einer primär biliären Zirrhose. Zwei Jahre später trat bei der Patientin eine Magenblutung bei erosiver Gastritis auf. Außerdem wurden Oesophagusvarizen und Aszites festgestellt.

In der Immunfluoreszenz waren Antikörper gegen Mitochondrien und glatte Muskulatur nachweisbar.

Anti-M2- und anti-M8-Antikörper waren in der KBR hochtitrig positiv, anti-M4-Antikörper waren jedoch nicht vorhanden. Die Immunglobuline vom IgM-Typ waren stark erhöht, die vom IgG-Typ nur mäßig erhöht.

Die Erkrankung zeigte eine deutliche Aktivität: Die alkalische Phosphatase und die Transaminasen stiegen im Verlauf der Erkrankung massiv an, auch der Bilirubinwert wurde pathologisch.

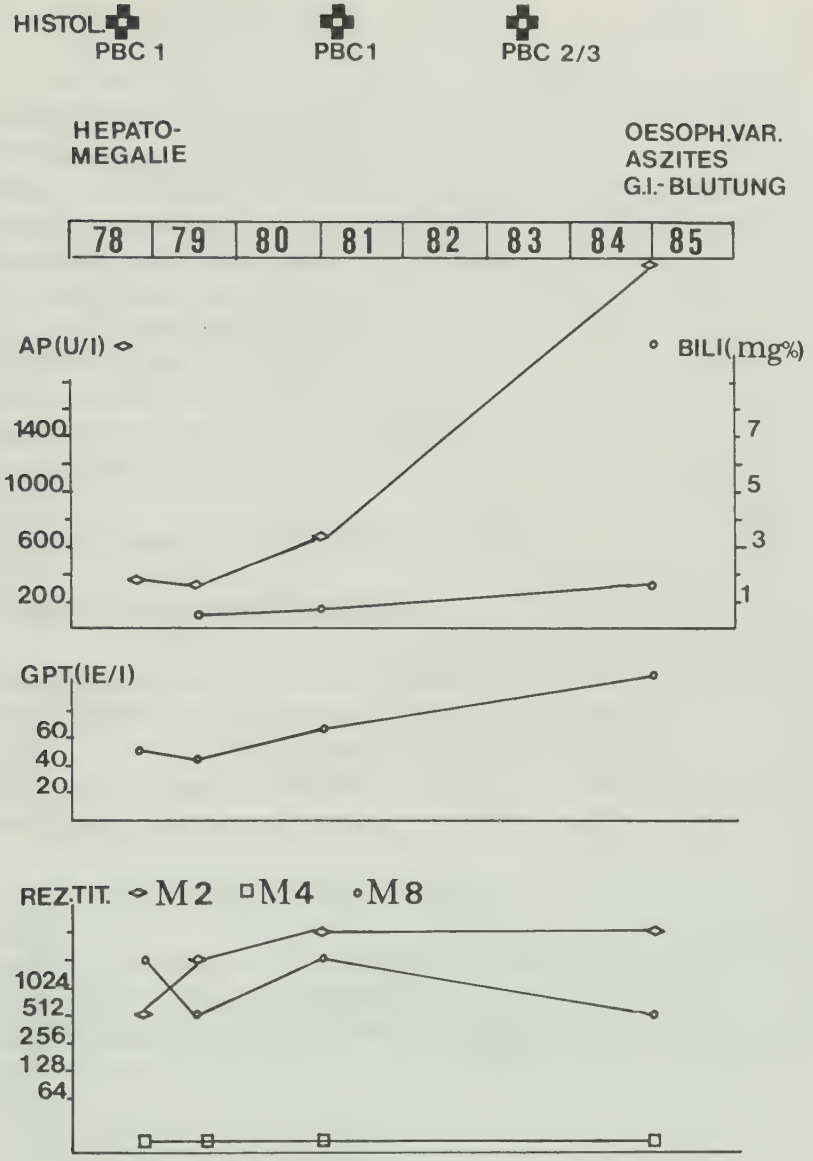


Abb. 17: Krankheitsverlauf einer Patientin (M. B., geb. am 16. 1. 36) mit PBC vom Typ 2 (anti-M2-positiv, anti-M4-negativ und anti-M8-positiv)

3.4.3.3 Mischform Typ 1: Patientin P.R., geb.am 15.6.1934

Bereits mit 33 Jahren traten bei der Patientin brennende, teilweise auch krampfartige, Schmerzen im rechten Oberbauch nach den Mahlzeiten auf. Das damals entnommene Leberpunktat zeigte eine chronisch aggressive Hepatitis mit dicht gepackten Rundzellinfiltraten. In den darauffolgenden Jahren kamen klinisch Pruritus, Abgeschlagenheit, Xanthelasmen und Hautpigmentation hinzu. Zehn Jahre später wurde eine Hepatomegalie diagnostiziert. Zu diesem Zeitpunkt wurde eine Steroid-Therapie, kombiniert mit D-Penicillamin, begonnen. Bereits 3 Jahre später wies die Leberhistologie auf eine PBC im Stadium 2 bis 3, herdförmig sogar auf das Stadium 4 hin. Die Leber reichte bis zum Beckenkamm. Ein Sicca-Syndrom mit Xerostomie und Xerophthalmie trat zusätzlich auf. Nach zwei weiteren Jahren waren Zeichen der portalen Hypertension mit Oesophagusvarizen dritten Grades und einer Splenomegalie deutlich ausgeprägt.
Antikörper gegen glatte Muskulatur und Mitochondrien waren in der IFL deutlich positiv.
Serologisch waren bei der Patientin anti-M2, anti-M4 und anti-M8-Antikörper in der KBR hochtitrig nachweisbar.
Im Gegensatz zur typischen Konstellation bei der PBC war die Immunglobunlinerhöhung der IgG-Klasse deutlich stärker als die der IgM-Klasse. Im Endstadium war auch eine IgA-Erhöhung nachweisbar.
Der Bilirubinwert überschritt schon sehr früh den Grenzwert. Transaminasen und alkalische Phosphatase waren während des gesamten Verlaufes erhöht.
Sowohl klinisch, wie auch histologisch liegt hier eine ausgeprägte Krankheitsaktivität vor.
1985 wurde bei der Patientin eine orthotope Lebertransplantation durchgeführt. Interessant war die Antikörperkonstellation in einer Serumprobe, die 1986 entnommen wurde: Anti-M2- und anti-M4-Antikörper waren schwachtitrig vorhanden, anti-M8-Antikörper waren in der KBR nicht nachweisbar.

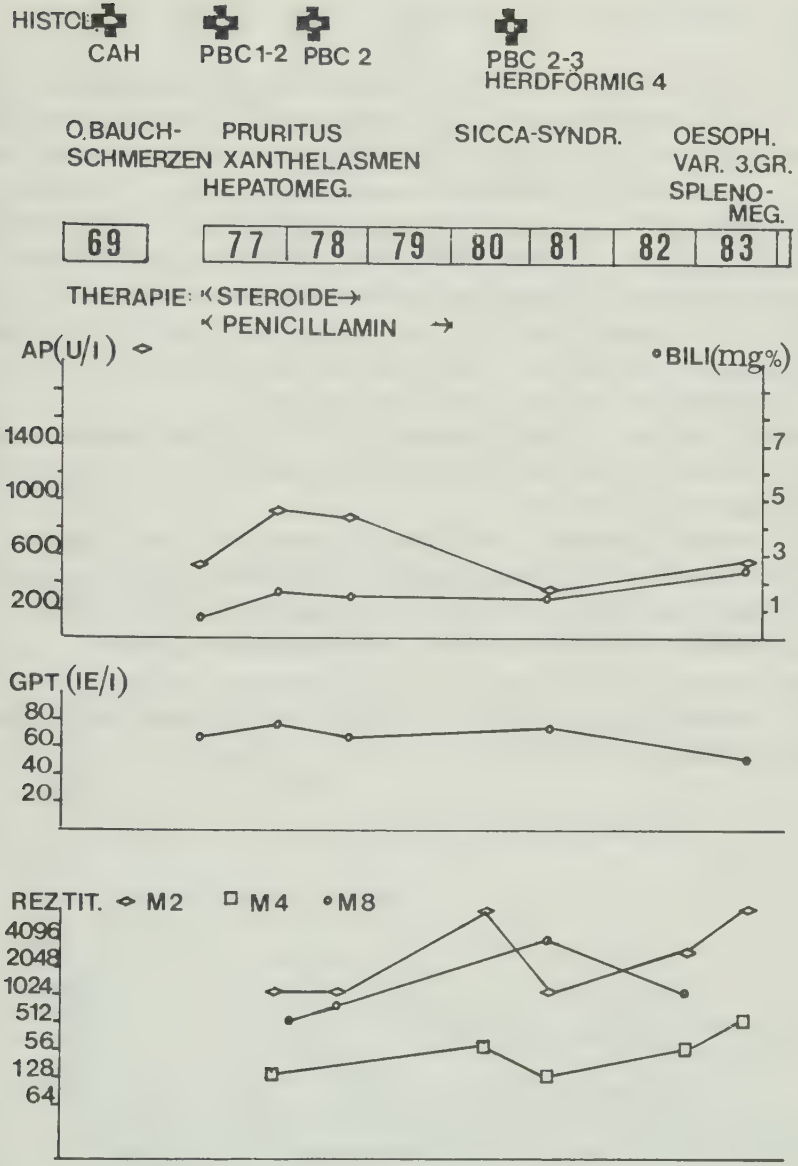


Abb. 18: Krankheitsverlauf einer Patientin (P. R., geb. am 15. 6. 34) mit Mischform 1 (anti-M2-, anti-M4- und anti-M8-positiv)

3.4.3.4 Mischform Typ 2: Patientin S. I., geb. am 31.3.1932

Im Alter von 43 Jahren wurde die Patientin erstmalig wegen einer histologisch gesicherten PBC stationär behandelt. Eine kombinierte Kortikosteroid-Azathioprin-Therapie wurde begonnen und über Jahre hin beibehalten. Die mehrmals entnommenen Leberbiopsien wiesen histologisch auf eine Mischform zwischen PBC und CAH hin. Vier Jahre nach Diagnosestellung wurde eine Hepatomegalie festgestellt. Ein Jahr später trat ein quälender Juckreiz auf. Die damals entnommene Leberbiopsie wurde histologisch als PBC Stadium 1 bis 2 eingestuft. Nach einem weiteren Jahr wurde eine Splenomegalie diagnostiziert. Die zehn Jahre nach Krankheitsbeginn entnommene Leberbiopsie zeigte das histologische Stadium 4 einer PBC.

Antimitochondriale Antikörper waren in der IFL nachweisbar. Anti-M2- und anti-M8-Antikörper waren in der KBR deutlich positiv, dazuhin waren anti-MF2-Antikörper vorhanden.

Eine deutliche Krankheitsaktivität wurde sowohl an morphologischen wie auch biochemischen Parametern sichtbar. Die Transaminasen und die alkalische Phosphatase waren trotz der Steroidtherapie stark erhöht. Der von Anfang an erhöhte Bilirubinwert stieg auf Werte von über 15 mg% an.

Auch bei dieser Patientin wurde 1985 eine Lebertransplantation durchgeführt. In einer Serumprobe vom Januar 1986 waren weder anti-MF2- noch anti-M8-Antikörper nachweisbar.

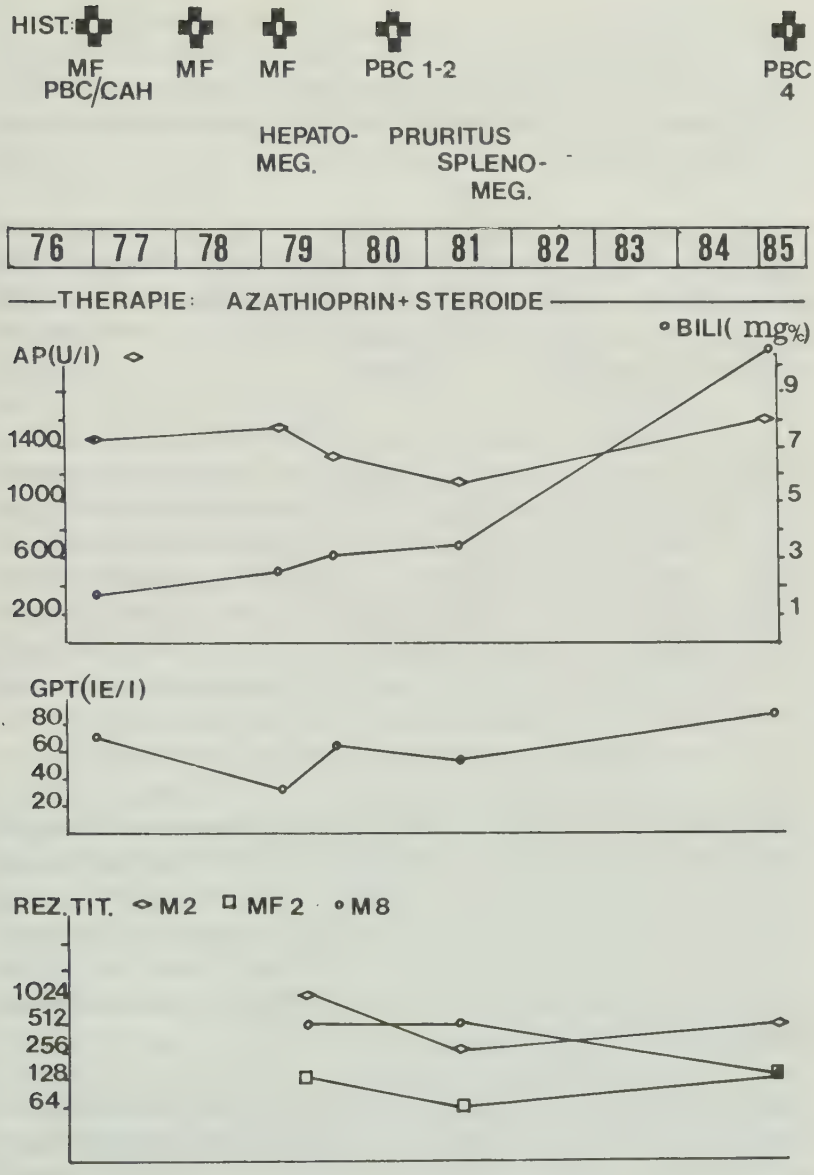


Abb. 19: Krankheitsverlauf einer Patientin (S. I., geb. am 31. 3. 32) mit Mischform 2 (anti-M2-, anti-MF2- und anti-M8-positiv)

4 DISKUSSION

Ein komplementbindendes Antigen - M8 genannt - konnte aus äußerer Mitochondrienmembran von Schweineniere, aus Schweinenierenmikrosomen und aus humanen Lebermikrosomen isoliert werden.

Ferner gelang es, eine klare Differenzierung von den zuvor beschriebenen Antigenen zu erreichen, dem M2 - Antigen, einem Antigen der inneren Mitochondrienmembran, das sich in den Dichten 1.16 bis 1.24 anreichert, und dem M4-Antigen, das sich im Kompartiment der äußeren Mitochondrienmembran und in den Dichten 1.08 bis 1.14 auffinden läßt.

Alle bisherigen Befunde legen nahe, daß das M8-Antigen Bestandteil der äußeren Mitochondrienmembran ist. Zum einen wurde das M8-Antigen in einer relativ reinen Fraktion äußerer Mitochondrienmembran aus Schweineniere gefunden. Bei der weiteren Reinigung der Antigenfraktion ging der isolierte Nachweis des M8-Antigens mit dem Abfall der Aktivität der enzymatischen Marker für innere Mitochondrienmembran und Mikrosomen parallel, eine hohe Aktivität der Rotenon-insensitiven NADH-Cytochrom-C-Reduktase war jedoch in allen gereinigten M8-Fraktionen vorhanden. Zum anderen konnten komplementbindende mikrosomale Antikörper (in LKM-Markerseren) in gereinigten M8-Fraktionen nicht nachgewiesen werden.

Das M8-Antigen konnte jedoch auch aus einer mikrosomalen Präparation isoliert werden. Die Differenzierung dieser zwei Membransysteme, die trotz ihrer strukturellen Ähnlichkeiten ihre eigenen Enzymsysteme haben, aber in situ in solch enger Apposition gefunden werden, ist schwierig. Alle Arbeitsgruppen, die sich mit der Isolierung von Mikrosomen befassen, berichten von einer Kontamination der mikrosomalen Fraktion mit äußerer Mitochondrienmembran.

ERIKSON (28) wie auch DALLNER (25) machen auf die Schwierigkeit aufmerksam, daß eine intensive und wiederholte mechanische Behandlung, wie es die Potterhomogenisation darstellt, zwar die einzige Möglichkeit darstellt, intrazelluläre Organellen zu befreien, daß aber auf der anderen Seite aus solch einer intensiven Potterhomogenisation eine Zerstörung verschiedener Zellmembraneinheiten resultiert, wie z.B. die der Plasmamembranen, Golgi-

vesikel und äußeren Mitochondrienmembranen. Eine effektive Homogenisation des relativ widerstandsfähigen Gewebe der Schweineniere, bei dem der Potterhomogenisation sogar mehrmaliges Mixen vorgeschaltet werden muß, wird daher immer die Isolierung einer kontaminierten Präparation zur Folge haben.

Nimmt man an, daß äußere Mitochondrienmembran und endoplasmatisches Retikulum gleichen phylogenetischen Ursprungs sind, so ist man nicht überrascht, daß auch aus einer mikrosomalen Präparation das M8-Antigen zu gewinnen ist. SCHNAITMAN (76) weist darauf hin, daß eine große Anzahl von ähnlichen Proteinen in der Fraktion der äußeren Mitochondrienmembran und in der des glatten endoplasmatischen Retikulums gefunden wird.

Wenn größere Mengen an M8-Antigen präpariert werden sollen, empfiehlt es sich, beschallte Schweinenierenmikrosomen, die äußere Mitochondrienmembran enthalten, als Ausgangsmaterial zu verwenden. Durch Gelchromatographie konnte aus dieser mikrosomalen Präparation im Anfangsteil des zweiten Peaks eine Antigenfraktion isoliert werden, die hohe komplementbindende Aktivität des M8-Antigens aufwies und die anderen mitochondrialen Antigene M2 bis M6 nicht enthielt.

Humane Leber ist wegen des wechselnden Zustandes des postmortalen Gewebes, der vom Grad der Autolyse und der Art der zugrunde liegenden Erkrankung abhängig ist, weniger geeignet für die Isolation von M8. Wegen der geringen komplementbindenden Aktivität von M2 im humanen Gewebe kann die Präparation aus humaner Leber allerdings eine gute Diskriminierung zwischen anti-M2 und anti-M8 liefern.

Diese beiden Isolierungsmöglichkeiten des M8-Antigens machen deutlich, daß M8 weder speziesspezifisch noch organspezifisch ist. Eine Isolierung des M8-Antigens aus Rinderherz war nicht möglich, da durch eine M2-Kontamination in dieser Präparation eine Differenzierung nicht möglich war. In Rattenleberpräparationen wurden weder das M2- noch das M8-Antigen gefunden.

Elektrophoretisch konnte das M8-Antigen in fünf starke und neun schwache Banden aufgegliedert werden. Diese Banden deckten sich nicht mit den Ban-

den des M2-Antigens. In der Ionenaustauschchromatographie konnte der das M8 enthaltende Peak 2/1 in weitere vier Peaks aufgetrennt werden, von denen nur einer M8-Aktivität aufwies (unveröffentlichte Ergebnisse). Die aktive komplementbindende Einheit des M8-Antigens hat ein Molekulargewicht von über 100 000. Von WEBER (90) wurde das Molekulargewicht auf 340 000 geschätzt. Dieser Befund, zusammen mit der Wärmeinstabilität von M8 läßt neben der Proteinkomponente eine Lipidkomponente bei M8 vermuten, also einen Lipoproteincharakter, wie er bei vielen Membranantigenen als integrierende Strukturelemente tierischer Zellen und ihrer subzellulären Partikel zu finden ist.

Die Aktivitätsverminderung von M8 durch Quecksilberbehandlung bzw. die Stabilisierung durch DTT (Dithiotreitol), das zur selektiven Reduktion von S-S-Brücken führt, legen nahe, daß SH-Gruppen an der antigenetischen Formation des M8-Antigens beteiligt sind. Da die M8-Aktivität nicht durch DNAse, sondern nur durch Proteasen zerstört werden konnte, konnte ausgeschlossen werden, daß DNA an der komplementbindenden Determinante beteiligt ist. Das M8-Antigen ist trypsin-sensitiv im Gegensatz zu M4, das trypsin-insensitiv ist, und gleicht in dieser Hinsicht dem M2-Antigen. Nach einer diskontinuierlichen Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation konnte M8 in den Dichten 1.16 bis 1.19 gefunden werden.

Der Nachweis von komplementbindenden anti-M8-Antikörpern ist von klinischer Bedeutung.
Bei 134 histologisch gesicherten PBC-Patienten trat der anti-M8-Antikörper mit einer Häufigkeit von 38 % auf. Die anti-M8-negativen (PBC Typ 1) und anti-M8-positiven (PBC Typ 2) Patienten wurden weiterhin in Bezug auf die histologischen Stadien untersucht. Dabei stellte sich heraus, daß von den anti-M8-negativen Patienten etwas mehr als die Hälfte sich in der Frühphase befanden. Bei den anti-M8-positiven Patienten war das Verhältnis stärker zur Spätphase hin verschoben, so daß über 70 % zur Spätphase zuzurechnen waren. Da es bisher keine Hinweise dafür gibt, daß anti-M8-Antikörper erst später im Verlauf der Erkrankung auftreten, legt dies nahe, daß bei den anti-M8-positiven Patienten die Frühphase schneller durchschritten wird. Dies steht auch mit der Beobachtung im Einklang, daß bei den anti-M8-positiven Patienten häufiger die Bilirubinwerte im pathologischen Bereich liegen. Dabei muß man berücksichtigen, daß der Bilirubinwert bei der PBC erst in spä-

teren Stadien ansteigt. Von vielen Autoren werden erhöhte Bilirubinwerte als Indikator für eine schlechte Prognose angegeben (23, 68, 78). In Übereinstimmung mit dieser Interpretation der Befunde stehen auch Beobachtungen von WECKENMANN et al. (91), die zeigten, daß die Erstbiopsie von M8-positiven Patienten häufiger schon fortgeschrittenere Stadien aufwies, und daß außerdem bei der retrospektiven Analyse der Krankheitsverläufe in der Gruppe der M8-positiven Patienten schneller das Stadium 4 erreicht wurde und sich alle zwischenzeitlich verstorbenen Patienten in dieser Gruppe befanden. Außerdem wurde neben dem progressiveren Verlauf auch auf das häufigere Auftreten von zusätzlichen Antikörpern gegen Kerne (ANA) und glatte Muskulatur (SMA) hingewiesen. Die SMA-Antikörper, meist gegen Aktin gerichtet, können als Indikator für das Vorliegen eines entzündlichen Prozesses gegen Lebermembranantigene, mit denen Aktin assoziiert ist, angesehen werden (93).

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß der Nachweis von komplementbindenden Antikörpern gegen das M8-Antigen, die immer in Assoziation mit dem Nachweis von anti-M2-Antikörpern auftreten, im Zusammenhang steht mit symptomatischen und meist auch aktiv verlaufenden Formen der PBC.

Die aus der mikrosomalen Präparation gewonnene M8-Fraktion konnte auch in einem Enzym-Immunoassay, dem ELISA, mit welchem auch andere als komplementbindende Antikörper nachgewiesen werden können, gegen Seren getestet werden. Dabei fiel die Reaktion bei etwa weiteren 15 % der PBC-Patienten positiv aus. Allerdings reagierte auch ein Teil der gesunden Normalbevölkerung und Patienten mit chronisch-entzündlichen Erkrankungen wie z.B. Vaskulitiden mit dieser Fraktion positiv (unveröffentlichte Ergebnisse). Von BERG und KLEIN (13) wurde die Frequenz der positiven Reaktion des Normalkollektives mit der mikrosomalen M8-Fraktion im ELISA mit 10 % angegeben. Seit Fertigstellung dieser Arbeit wurde durch weitere Untersuchungen herausgefunden, daß für diese positive Reaktion des Normalkollektives wie auch der Kollektive mit chronisch entzündlichen Erkrankungen nicht das M8-Antigen, sondern Cytoskeleton-Antigene, worunter an erster Stelle Laminin zu nennen ist, verantwortlich sind (persönliche Mitteilung von Frau Reinhild Klein). Infolgedessen können bisher die Befunde, die sich aus dem ELISA zum Nachweis von anti-M8-Antikörpern ergeben, immer nur in Assoziation mit dem für die PBC-spezifischen anti-M2-Antikörper inter-

pretiert werden. Mit dem ELISA ist eine Möglichkeit gegeben, antikomplementäre Seren, deren Testung in der KBR nicht möglich ist, auf anti-M8-Antikörper zu untersuchen.

Seitdem antimitochondriale Antikörper nicht nur in der KBR, sondern auch im ELISA nachgewiesen werden können, wurde im Hinblick auf die prognostische Relevanz eine Einteilung der PBC in vier Subgruppen mit den AMA-Profilen A - D eingeführt, wobei vor allem die Subgruppen mit den AMA-Profilen der nicht-komplementbindenden Antikörper A und B der Subgruppe D mit den komplementbindenden Antikörpern gegenübergestellt werden (13, 15).

Aus retrospektiven Analysen ergab sich, daß Patienten der Gruppe A (nur anti-M9 im ELISA positiv) oft 10 bis 15 Jahre lang im Stadium 1 blieben, während Patienten der Gruppe D (anti-M2, anti-M4 und/oder anti-M8 in KBR und ELISA) meist rasch in ein Stadium der Zirrhose vorangeschritten waren. Gruppe C (anti-M2 im ELISA,meist auch in der KBR positiv, anti-M4 und anti-M8 nur im ELISA positiv) nahm eine Mittelstellung in Bezug auf die Krankheitsaktivität ein. Demzufolge können anhand dieser Einteilung nach den bisherigen Beobachtungen Aussagen über den Verlauf und somit die Prognose dieser Erkrankung gemacht werden (15).

Die hierbei sichtbar werdende Bedeutung der komplementbindenden Antikörper hinsichtlich des Krankheitsverlaufes steht im Einklang mit zahlreichen Veröffentlichungen über die pathogenetische Rolle des Komplementsystems bei der PBC. Erhöhte Spiegel der Konversionsprodukte der Komplementfaktoren in der Zirkulation (39), häufiges Vorkommen von zirkulierenden Immunkomplexen (8, 89), in denen sowohl biliäre Antigene (4) wie auch antimitochondriale Antikörper (62) nachgewiesen werden konnten, und die Einbeziehung des klassischen wie auch des alternativen Komplementsystems (64) sprechen für eine abnorme Aktivierung des Komplementsystems, die für das Inganghalten des entzündlichen Prozesses und die Zellzerstörung verantwortlich sein könnte.

Demzufolge wird es weiterhin von Wichtigkeit sein, die komplementbindenden Antikörper als gesonderte Antikörperspezifität in Seren von Patienten mit PBC zu bestimmen. Da für Komplementbindungsreaktionen relativ viel

Antigen benötigt wird, war es wesentlich, einfachere Isolierungsmethoden zu finden. Mit der Präparation des M8-Antigens aus Schweinenierenmikrosomen steht uns ein Verfahren zur Verfügung, das eine hohe Antigenausbeute bei vergleichsweise geringem technischen und apparativem Aufwand erbringt. Die Isolierungszeit wurde gegenüber der herkömmlichen Methode von 3 Tagen auf 1 1/2 Tage herabgesetzt. Das ist bei der begrenzten Haltbarkeit des M8-Antigens aufgrund seiner Wärmeinstabilität für Nachweismethoden, die eine längere Inkubationszeit erfordern, wie z.B. den ELISA, oder für weitere Reinigungsverfahren der Antigenfraktion von Bedeutung.

Somit ist es möglich geworden, anti-M8-Antikörper sowohl in der Komplementbindungsreaktion wie auch im ELISA routinemäßig zu bestimmen. Die dadurch neu gewonnenen Daten werden dazu beitragen können, die Relevanz der unterschiedlichen Antikörperprofile im Hinblick auf die Verlaufsbeurteilung und das Ansprechen auf verschiedene Therapieformen noch weiter aufzuklären.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Zwei neue Isolierungsmethoden des M8-Antigens wurden entwickelt. 1. Es gelang, das komplementbindende M8-Antigen aus äußerer Mitochondrienmembran von Schweineniere zu isolieren. Mit Hilfe von serologischen und enzymatischen Markern für innere und äußere Mitochondrienmembran sowie Mikrosomen ließ sich zeigen, daß das M8-Antigen mit der äußeren Mitochondrienmembran assoziiert ist. 2. Die Isolierung von M8 aus einer mikrosomalen Präparation von Schweineniere, die stets mit äußerer Mitochondrienmebran kontaminiert ist, erlaubte die relativ einfache Gewinnung größerer Antigenmengen für Routinezwecke. Außerdem wurde die Isolierungszeit, die bei der herkömmlichen Methode 3 Tage betrug, auf 1 1/2 Tage herabgesetzt. Dies ist wegen der begrenzten Haltbarkeit des M8-Antigens für Nachweismethoden, die eine längere Inkubationszeit erfordern, wie z.B. den ELISA, von Bedeutung. Ferner konnte das M8-Antigen aus verschiedenen tierischen und menschlichen Geweben isoliert werden, woraus hervorgeht, daß es weder organ- noch speziesspezifisch ist.

In weiteren Untersuchungen zur klinischen Relevanz der komplementbindenden Antikörper ließ sich zeigen, daß diese auch für die prognostische Beurteilung der PBC von Bedeutung sein können. Aufgrund des Antikörperprofils, das sich aus der unterschiedlichen Konstellation der drei komplementbindenden antimitochondrialen Antikörper anti-M2, anti-M4 und anti-M8 ergibt, können drei Untergruppen der PBC unterschieden werden: Die PBC vom Typ 1, bei der nur anti-M2-Antikörper nachgewiesen werden können (anti-M2-positiv, anti-M4- und anti-M8-negativ), die PBC vom Typ 2, die neben den anti-M2-Antikörpern auch noch anti-M8-Antikörper aufweist (anti-M2- und anti-M8-positiv, anti-M4-negativ) und die Mischform, bei der Antikörper aller drei Antigensysteme nachweisbar sind (anti-M2-, anti-M4- und anti-M8-positiv). Dank der relativ einfachen Gewinnung von M8 ist es möglich geworden, diese verschiedenen Antikörperprofile nun auch routinemäßig bei der PBC zu bestimmen.

6 LITERATURVERZEICHNIS

1. Addison, T., Gull, W., (1851)
On a certain affection of the skin vitiligoidea-a-plana, b-tuberosa
Guy's Hosp., Rep. 7, 265-277

2. Ahrens, E.H., Payne, M.A., Kunkel, E.G., Eisenmeyer, W.J., Blondheim, S.J.H. (1950)
Primary biliary cirrhosis
Medicine (Baltimore) 29, 299-364

3. Alarçon-Segovia, D., Diaz-Jovanen, E., Fishbein, E. (1973)
Features of Sjögren's syndrome in primary biliary cirrhosis
Ann. Intern. Med. 79, 31-36

4. Amoroso, P., Vergagni, D., Wojzicka, B.H., MacFarlane, I.G., Eddlestone, A.L.W.R., Tee, D.H.E., Williams, R., (1980)
Identification of biliary antigens in circulating immune complexes in primary biliary cirrhosis
Clin. Exp. Immunol. 42, 95-98

5. Araki, T. (1977)
Freezing injury in mitochondrial membranes, Degradation of phospholipid in rabbit liver mitochondria during freezing and storage at low temperatures
Cryobiology 14, 151-159

6. Baginski, E.S., Foa, P.P., Zak, B. (1974)
Glucose-6-Phosphatase
In: Bergmayer: Meth. der enzymatischen Analyse, 909-913

7. Baum, H., Berg, P.A., (1981)
The complex nature of mitochondrial antibodies and their relation to primary biliary cirrhosis
Seminars in Liver Disease Vol. 1, 4, 309-321

8. Bartel, J., Müting, D., Dölle, W., Berg, P.A., (1984)
Nachweis und Bedeutung von zirkulierenden Immunkomplexen bei der

primär biliären Zirrhose
Verh. dtsch. Ges. inn. Med. 90, 1508-1510

9. Berg, P.A. (1982)
Klinik und Immunologie der autoimmunen chronisch aktiven Hepatitis und der primär biliären Zirrhose
Immun. Infekt. 10, 3-14

10. Berg, P.A., Baum, H. (1980)
Serology of primary biliary cirrhosis
Springer Seminars Immunpathol. 3, 355-373

11. Berg, P.A., Doniach, D., Roitt, J.M. (1967)
Mitochondrial antibodies in primary biliary cirrhosis. I. Localization of the antigen to mitochondrial membranes
J. Exp. Med. 126, 277-290

12. Berg, P.A., Homberg, J.C., Bottazzo, G.F., Doniach, D. (1981)
Clinical significance of mitochondrial antibodies in relation to liver disease
Lancet II, 4169-4170

13. Berg, P.A., Klein, R. (1985)
Clinical and prognostic relevance of different mitochondrial antibody profiles in primary biliary cirrhosis (PBC)
Mol. Aspects Med., Vol.8, 235-247

14. Berg, P.A., Klein, R. (1985)
Autoimmune chronisch aktive Hepatitis und primär biliäre Zirrhose
Therapiewoche 35, 255-268

15. Berg, P.A., Klein, R (1986)
Klinische Relevanz mitochondrialer Antikörper bei der primär biliären Zirrhose und anderen Erkrankungen (Anti-M1 bis Anti-M9)
Therapiewoche 36, 3500-3510

16. Berg, P.A., Klein, R., Lindenborn-Fotinos, J., Klöppel, G. (1982)
ATPase associated antigen (M2): marker antigen for serological diagnosis of primary biliary cirrhosis

Lancet II, 1423-1426

17. Berg, P.A., Klein, R., Lindenborn-Fotinos, J. (1986)
Antimitochondrial antibodies in primary biliary cirrhosis
Hepatol. 2, 123-131

18. Berg, P.A., Roitt, J.M., Doniach, D., Cooper, H.M. (1969)
Mitochondrial antibodies in primary biliary cirrhosis. IV. Significance of membrane structure for the complement fixing antigen
Immunology 17, 281-295

19. Berg, P.A., Stechemesser, E., Strienz, J. (1981)
Hypergammaglobulinämische chronisch aktive Hepatitis mit Nachweis von Leber-Pankreas-spezifischen komplementbindenden Autoantikörpern
Verh. dtsch. Ges. Inn. Med. 87, 921-927

20. Berg, P.A., Weber, P., Oehring, J., Lindenborn-Fotinos, J.,Stechemesser, E. (1984)
Significance of different types of mitochondrial antibodies in primary biliary cirrhosis
In: H. Brunner and H. Thaler: Hepatology: A Festschrift for Hans Popper.
New York, Raven Press, 231-241

21. Berg, P.A., Wiedmann, K.H., Sayers, T.J., Klöppel, G., Lindner, H. (1980)
Serological classification of chronic cholestatic liver disease by use of two different types of antimitochondrial antibodies
Lancet II, 1329-1332

22. Bradford, M.M. (1976)
A rapid and sensitive method for the quantitations of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding
Anal. Biochem. 72, 248-254

23. Christensen, E., Crowe, J., Doniach, D., Popper, H., Ranek, L., Rodes, J., Tygstrup, N., Williams, R. (1980)
Clinical pattern and course of disease in primary biliary cirrhosis based on an analysis of 236 patients

Gastroenterology 78, 236-246

24. Dallner, G. (1974)
Isolation of Rough and Smooth Microsomes-General
Meth. Enzymol. 31, 191-201

25. Dallner, G. (1978)
Isolation of microsomal subfractions by use of density gradients
In: Fleischer, S., Packer, L. (eds.)
Meth. Enzymol. 52, 71- 83

26. Engvall, E. (1980)
Enzyme Immunoassay ELISA and EMIT
Meth. Enzymol. 70, 419-439

27. Epstein, O., Thomas, H.C., Sherlock, S. (1980)
Primary biliary cirrhosis is a "dry gland" syndrome with features of chronic graft-versus-host (GVH) disease
Lancet I, 1166-1168

28.Erikson, L.C. (1978)
Preparation of liver microsomes with high recovery of endoplasmatic reticulum and a low grade of contamination
Biochimica et Biophysica Acta 508, 155-164

29. Feizi, T., Naccarato, R., Sherlock, S., Doniach, D. (1972)
Mitochondrial and other tissue antibodies in relatives with primary biliary cirrhosis
Clin. Exp. Immunol. 10, 609-622

30. Galbraith, R.M., Smith, M., Mackenzie, R.M., Tee, D.E., Doniach, D., Williams, R. (1974)
High prevalence of seroimmunologic abnormalities in relatives of patients with active chronic hepatitis or primary biliary cirrhosis
N. Engl. J. Med. 290, 63-69

31. Geubel, A.P., Baggenstoss, A.H., Summerskill, W.H.J. (1976)

Responses to treatment can differentiate chronic active liver disease with cholangitic features from the primary biliary cirrhosis syndrome
Gastroenterology 71, 444-449

32. Golding, P.L., Brown, R., Mason, A.M.S., Taylor, E. (1970)
'Sicca complex' in liver disease
Br . Med. J. 4, 340-342

33. Hamlyn, A.N., Adams, D., Sherlock, S. (1980)
Primary or secondary sicca complex? Investigation in primary biliary cirrhosis by histocompatibility testing
Br. Med. J. 281, 425-426

34. Hamlyn, A.N., Macklon, A.M., James, O. (1983)
Primary biliary cirrhosis (PBC): controlled study of epidemicity and symptom onset seasonality (Abstract)
Gut 21, A 899

35. Hislop, W.S. (1980)
Primary biliary cirrhosis: an epidemiological study (letter)
Br. Med. J. 281, 1069-1070

36. Homberg, J.C., Stelly, C., Andreis, I., Abuaf, N., Saadoun, F., André, J. (1982)
A new antimitochondrial antibody (anti-M6) in iproniazid-induced hepatitis
Clin. Exp. Immunol. 47, 93-102

37. Jain. S., Scheuer, P.J., Samurian, S., McGee, J.O'G., Sherlock, S., (1977)
A controlled trial of D-Penicillinamin therapy in primary biliary cirrhosis
The Lancet, 16, 831-834

38. James, S.P., Hoofnagle, M.D., Strober, W., Jones, A. (1983)
Primary biliary cirrhosis: a model autoimmune disease
Ann. Intern. Med. 90, 72-84

39. Jones, E.A., Frank, M.M., Jaffé, C.J., Vierling, J.M. (1979)
Primary biliary cirrhosis and the complement system

Ann. Intern. Med. 90, 72-84

40. Kato, Y., Suzuki, K., Kumagai, M., Nishimura, K., Miyamori, H., Kobayashi, K., Hattori, N., Nakanuma, Y. (1981)
Familial primary biliary cirrhosis
Am. J. Gastr. 75, 188-191

41. Klein, R., Berg, P.A. (1984)
Organ specific antibodies against liver mitochondria (anti-M9) in patients with primary cirrhosis and their relatives
Hepatology 4, 750 (Abstract)

42. Klein, R., Lindenborn-Fotinos, J., Berg, P.A. (1983)
Use of ATPase-associated antigen (M2) for detection of antimitochondrial antibodies in primary biliary cirrhosis by fluorometric immunoassay
J. Immunol. Meth. 64, 227-238

43. Klein, R., Maisch, B., Kochsiek, K., Berg, P.A. (1984)
Demonstration of organ specific antibodies against heart mitochondria (anti-M7) in sera from patients with some forms of heart diseases
Clin. Exp. Immunol. 58, 283-292

44. Klein, R., Müting, D., Fintelmann, U., Klöppel, G., Berg, P.A. (1985)
Anti-M9 - A marker antibody for early asymptomatic primary biliary cirrhosis
J. Hepatol. 52, 5264 (Abstract)

45. Klöppel, G., Kirchhof, M., Berg, P.A. (1982)
Natural course of PBC: I. A morphological, clinical and serological analysis of 103 cases
Liver 2, 141-151

46. Klöppel, G., Seifert, G., Lindner, H., Dammermann, R., Sack, H.J., Berg, P.A. (1977)
Histopathological features in mixed types of chronic aggressive hepatitis and primary biliary cirrhosis
Virchows Arch. A 373, 143-160

47. Labro, M.T., Andrieu, M.C., Weber, M., Homberg, J.C. (1978)
A new pattern of non-organ- and non-species-specific anti-organelle antibody detected by immunfluorescence: the mitochondrial antibody number 5
Clin. Exp. Immunol. 31, 357-366

48. Lämmli, U., (1970)
Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4
Nature 227, 680-685

49. Lindenborn-Fotinos, J., Baum, H., Berg, P.A. (1985)
Mitochondrial antibodies in primary biliary cirrhosis: Species and non-species specific determants of M2-Antigen
Hepatol. Vol. 5, 763-769

50. Lindenborn-Fotinos, J., Sayers, T.J., Berg, P.A. (1982)
Mitochondrial antibodies in primary biliary cirrhosis. VI. Association of the complement-fixing antigen with a component of the mitochondrial F 1-ATPase complex
Clin. Exp. Immunol. 50, 267-274

51. Lowry, O.H., Rosebrough, M.J., Farr, A.L., Randall, R.J. (1951)
Protein measurement with the Folin phenolreagent
J. Biol. Chem. 193, 265-275

52. Lüders, E.A., Kruck, P., Henning, H., Look, D. (1974)
Histologie und klinische Untersuchungen zur Differentialdiagnose der aggressiven chronischen Hepatitis und der primär biliären Leberzirrhose
Gastroenterology 12, 467-484

53. MacFarlane, J.G., Wojcicka, B.M., Zucker, G.M., Eddleston, A.L.W.F., Williams, R. (1977)
Purification and characterization of human liver-specific membrane lipoprotein (LSP)
Clin. Exp. Immunol. 27, 381-390

54. MacSween, R.N.M., Sumithran, E. (1981)
Histopathology of primary biliary cirrhosis
Seminars in Liver Disease, Vol. 1 No.4, 282-292

55. Mann, W.N. (1974)
Biliary cirrhosis: An appraisal
Guy's Hosp. Rep. 123, 197-219

56. Marx, W.J., O'Connell, D.J. (1979)
Arthritis of primary biliary cirrhosis
Arch. Intern. Med. 139, 213-216

57. Meek, F., Khoury, E.L., Doniach, D., Baum, H. (1980)
Mitochondrial antibodies in chronic liver diseases and connective tissue disorders; further characteriziation of the autoantigens
Clin. Exp. Immunol. 41, 43-54

58. Miyachi, K., Gupta, R.C., Dickson, E.R., Tan, E.M. (1980)
Precipitating antibodies to mitochondrial antigens in patients with primary biliary cirrhosis
Clin. Exp. Immunol. 39, 599-606

59. Munoz, L.E., Thomas, H.C., Scheuer, P.J., Doniach, D., Sherlock, S. (1981)
Is mitochondrial antibody a diagnostic marker of primary biliary cirrhosis?
Gut 22, 136-140

60. Murray-Lyon, I.M., Thompson, R.P.H., Ansell, I.D., Williams, R. (1970)
Scleroderma and primary biliary cirrhosis
Br. Med. J., 258-259

61. Neuberger, J., Portmann, B., MacDougall, B.R.D., Caline, R.Y., Williams, R. (1982)
Recurrence of primary biliary cirrhosis after liver transplantation
N. Engl. J. Med. 306, 1-4

62. Penner, E.H., Goldenberg, H., Albini, B., Weiser, M.M., Milgram, F. (1982)

Immune complexes in primary biliary cirrhosis contain mitochondrial antigens
Clin. Immunol. Immunpathol. 22, 394-399

63. Popper, H., Paronetto, F. (1980)
Clinical, histological and immunopathologic features of primary biliary cirrhosis
Springer Semin. Immunpathol. 3, 339-354

64. Potter, B.J., Elias, E., Jons, E.A. (1976)
Hypercatabolism of the third component of complement in patients with primary biliary cirrhosis
J. Lab. Clin. Med. 88, 427-439

65. Reynolds, T.B., Denison, E.K., Frankl, H.D, Liebermann, F.L., Peters, R.L. (1971)
Primary biliary cirrhosis with scleroderma, Raynaud's phenomenon and teleangiektasia
Am. J. Med. 50, 302-312

66. Rizzetto, M., Swana, G., Doniach, D. (1973)
Microsomal antibodies in active chronic hepatitis and other disorders
Clin. Exp. Immunol. 15, 331-344

67. Roitt , J.M., Doniach, D. (1969)
WHO manual for autoimmune serology
WHO Monograph Series, Geneva

68. Roll, J., Boyer, J.L., Barry, D., Klatskin, G. (1983)
The prognostic importance of clinical and histologic features in asymptomatic and symptomatic primary biliary cirrhosis
N. Engl. J. Med. 308, 1-7

69. Rubin, E., Schaffner, F., Popper, H. (1965)
Primary biliary cirrhosis: chronic non suppurative destructive cholangitis
Am. J. Pathol. 46, 387-407

70. Salaspuro, M.P., Laitinen, O.I., Lehtola, J., Makkonen, H., Räsänen, J.A., Sipponen, P. (1976)
Immunological parameters, viral antibodies and biochemical and histological findings in relatives of patients with chronic active hepatitis and primary biliary cirrhosis
Scand. J. Gastroent. 11, 313-320.

71. Sayers, T.J., Binder, T., Berg, P.A. (1979)
Heterogenity of antimitochondrial antibodies: characterization and separation of the antigen associated with the pseudolupus erythematodes syndrome
Clin. Exp. Immunol. 37, 68-75

72. Sayers, T.J., Leoutsakos, A., Berg, P.A., Baum, H. (1981)
Antimitochondrial antibodies (AMA) in primary biliary cirrhosis. I. Separation of the PBC antigen activity from mitochondrial ATPase activity
J. of Bioenergetics and Biomembranes 13, 255-267

73. Schaffner, F., Popper, H. (1982)
Clinical-pathologic relations in primary biliary cirrhosis
Progress in Liver Disease, Chapter 31, 529-554

74. Scheuer, P.J. (1967)
Primary biliary cirrhosis
Proc. R. Soc. Med. 60, 1257-1260

75. Schnaitman, C., Greenawalt, J.W. (1968)
Enzymatic properties of the inner and outer membrane of rat liver mitochondria
J. Cell Biology 38, 158-175

76. Schnaitman, C. (1969)
Comparison of rat liver mitochondrial and microsomal membrane proteins
Proc. N. A. S., Vol. 63, 412-418

77. Schultheiß, H.P., Berg, P.A., Klingenberg, M. (1983)
The mitochondrial adenine nucleotide translocator is an antigen in primary biliary cirrhosis

Clin. Exp. Immunol. 54, 648-654

78. Shapiro, J.M., Smith, H., Schaffner, F. (1979)
Serum bilirubin: a prognostic factor in primary biliary cirrhosis
Gut 20, 137-140

79. Sherlock, S. (1959)
Primary biliary cirrhosis
Gastroenterology 37, 574-586

80. Sherlock, S. (1981)
Treatment and prognosis of primary biliary cirrhosis
Seminars of Liver Disease 1, 354-364

81. Sherlock, S., Scheuer, P.J. (1973)
The presentation and diagnosis of 100 patients with primary biliary cirrhosis
N. Engl. J. Med. 289, 674-678

82. Smith, M.G.M., Williams, R., Walker, G., Rizzetto, M., Doniach, D. (1974)
Hepatic disorders associated with liver/kidney microsomal antibodies
Br. Med. J. 2, 80-84

83. Sottocasa, G.L., Kuylenstierna, B., Ernster, L., Bergstrand, A. (1967)
An electron-transport system associated with the outer membrane of liver mitochondria
J. Cell Biology 32, 415-438

84. Stechemesser, E., Berg P.A. (1979)
Differential diagnosis of cholestatic liver disease using a complement fixing PBC- and mixed form (MF)-specific subcellular antigen
Immunbiology Abstract. New York, Gustav Fischer Verlag, 156, 196

85. Thomas, N.S., de Villiers, D., Potter, H., Nodgson, H., Jain, S., Jewell, D.R., Sherlock, S. (1978)
Immune complexes in acute and chronic liver disease
Clin. Exp. Immunol. 31, 150-157

86. Triger, D.R. (1980)
Primary biliary cirrhosis: an epidemiological study
Br. Med. J. 281, 772-775

87. Walker, J.G., Bates, D., Doniach, D., Boll, P.A.J., Sherlock, S. (1972)
Chronic liver disease and mitochondrial antibodies: A family study
Br. Med. J. 1, 146-148

88. Walker, J.G., Doniach, D., Roitt, I.M., Sherlock, S. (1965)
Serological tests in the diagnosis of primary biliary cirrhosis
Lancet II, 827-831

89. Wands, I.R., Dienstag, J.L., Bhan, A.K., Feller, E.R., Isselbacher, K.J. (1978)
Circulating immune complexes and complement activation in primary biliary cirrhosis
N. Engl. J. Med. 298, 223-237

90. Weber, P., Brenner, J., Stechemesser, E., Klein, R., Weckenmann, U., Klöppel, G., Kirchhof, M., Fintelmann, V., Berg, P.A. (1986)
Characterization and clinical relevance of a new complement-fixing antibody - anti-M8 - in patients with primary biliary cirrhosis
Hepatol. Vol. 6, No. 4, 553-559

91. Weckenmann, U., Weber, P., Stechemesser, E., Klöppel, G., Berg, P.A. (1982)
Nachweis von Antikörpern gegen ein cytoplasmatisches Antigen bei Patienten mit primär biliärer Zirrhose (PBC) und ihre Bedeutung im Hinblick auf Krankheitsspezifität und Prognose
Verh. dtsch. Ges. inn. Med. 88, 1057-1061

92. Wiedmann, K.H., Berg, P.A. (1981)
Autoimmunphänomene bei gastrointestinalen Erkrankungen und Leberer-krankungen
Therapiewoche 31, 6419-6426

93. Wiedmann, K.H., Melms, A., Berg, P.A. (1983)

Anti-actin antibodies of IgM and IgG class in chronic liver diseases detected by fluometric immunoassay
Liver 3, 369-376

94. Wright, D.J.M., Doniach, D., Lessof, M.H., Turk, J.L., Grimble, A.S., Catterall, R.D. (1970)
New antibody in early syphilis
Lancet I, 740-744

Teile der vorliegenden Arbeit sind veröffentlicht in:

Berg, P.A., Weber, P., Oehring, J., Lindenborn-Fotinos, J., Stechemesser, E. (1984)
Significance of different types of mitochondrial antibodies in primary biliary cirrhosis
In: H. Brunner and H. Thaler: Hepatology: A Festschrift for Hans Popper. New York, Raven Press, 231-241

Weber, P., Brenner, J., Stechemesser, E., Klein, R. Weckenmann, U., Klöppel, G., Kirchhof, M., Fintelmann, V., Berg, P.A. (1986)
Characterization and clinical relevance of a new complement-fixing antibody - anti-M8 - in patients with primary biliary cirrhosis
Hepatol. Vol. 6 No. 4, 553-559

An dieser Stelle möchte ich mich bei Herrn Professor Dr. Berg für die sehr engagierte Betreuung bei der Durchführung und Fertigstellung der hier vorgestellten Arbeit bedanken. Seiner stets ansteckenden Begeisterung und Faszination für das Gebiet der Immunologie verdanke ich zahlreiche Anregungen und Ermutigung auch in schwierigen Situationen.

Herrn Ernst Stechemesser danke ich für die Einführung in die Methodik und seine geduldige Hilfestellung bei allen methodischen Problemen.

Mein Dank gilt auch allen weiteren Mitarbeitern des immunpathologischen Instituts für die gute Zusammenarbeit. Besonders hervorheben möchte ich an dieser Stelle Frau Reinhild Klein und Herrn Paul Weber, die mir mit ihrer freundlichen Hilfsbereitschaft zur Seite standen. Frau Jutta Lindenborn-Fotinos danke ich für die Durchführung der Elektrophorese.

Durch die von der Deutschen Forschungsgemeinschaft bereitgestellten Mittel wurden die Untersuchungen erst ermöglicht.

Lebenslauf

Judith Brenner

Am 10. 7. 1959 wurde ich als Tochter der Eheleute Gisela und Bruno Oehring in Braunschweig geboren. Von 1966 bis 1969 besuchte ich die Grundschule in Stuttgart – Bad Cannstatt bzw. Stuttgart–Botnang. Von 1969 bis 1978 besuchte ich das Dillmann–Gymnasium in Stuttgart, wo ich im April 1978 die Reifeprüfung ablegte.

Im Wintersemester 1978/79 begann ich das Medizinstudium an der Universität Tübingen. Die Ärztliche Vorprüfung legte ich dort im August 1980, den ersten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung im August 1981, den zweiten Abschnitt im März 1984 ab. Nach dem Praktischen Jahr am Städtischen Krankenhaus Sindelfingen schloß ich mein Medizinstudium am 25. 4. 1985 mit dem dritten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung ab.

Die Approbation als Ärztin erhielt ich am 2. Mai 1985.

Im Sommer 1981 begann ich unter Anleitung von Herrn Professor Berg an der Medizinischen Klinik Tübingen mit den in der vorliegenden Arbeit dargestellten Untersuchungen.

Zu meiner privaten Situation ist zu erwähnen, daß ich seit 21. 3. 1984 mit Herrn Hermann Brenner verheiratet bin. Am 26. 6. 1985 kam unsere erste Tochter zur Welt.